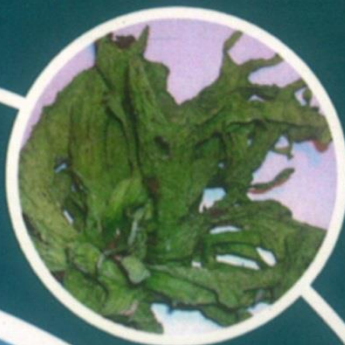


ISOLASI DAN PENENTUAN STRUKTUR **MOLEKUL SENYAWA** **KIMIA**

SERTA UJI AKTIVITAS BIOLOGI DARI THALUS RAMALINA INFLATA, HOOK., & TAYL



Yusnidar Yusuf



ISOLASI DAN PENENTUAN STRUKTUR MOLEKUL SENYAWA KIMIA

**SERTA UJI AKTIVITAS BIOLOGI DARI THALUS RAMALINA
INFLATA, HOOK., & TAYL**

**Oleh :
Yusnidar Yusuf**



2019



**ISOLASI DAN PENENTUAN STRUKTUR MOLEKUL
SENYAWA KIMIA SERTA UJI AKTIVITAS BIOLOGI DARI THALUS
RAMALINA INFLATA,
HOOK., & TAYL**

Hak cipta©2019 pada

Penulis

Yusnidar Yusuf

Editor:

-

Cover Desain

T.M. Sidiqi^(SEFA)

Layout

Rizka Indriani^(SEFA)

Pencetak dan Produksi

CV. Serfa Bumi Persada

Hak cipta dilindungi undang-undang.

*Dilarang memeperbanyak atau memindahkan sebagian atau seluruh
Isi buku ini dalam bentuk apapun, baik secara elektronis maupun
mekanis, termasuk memfotokopi, merekam atau dengan sistem
penyimpanan lainnya, tanpa izin tertulis dari penulis*

Penerbit :

SEFA BUMI PERSADA

Anggota IKAPI: No. 021 /DIA / 2018

Jl. B. Aceh-Medan., Alue Awe-Lhoksumawe

email:sefabumipersada@gmail.com

Telp. 085260363550

Cetakan I:2019

ISBN-97-623-7648-25-3

1.Hal.66:17,5cm x 25,5cm

1.Jdul

KATA PENGANTAR

Puji syukur penulis panjatkan kehadirat Allah SWT yang telah memberikan rahmat dan Hidayah-Nya, sehingga penulis dapat menyelesaikan penelitian ini, pada Program Studi Magister Ilmu Kimia pada Program Pasca Sarjana Universitas Indonesia.

Penulis yakin bahwa tanpa bantuan dari semua pihak, penelitian ini tidak dapat terselesaikan. Semoga amal ibadah Bapak – Bapak dan Ibu – Ibu serta Rekan – Rekan akan memperoleh imbalan yang setimpal dari Allah SWT

Penulis menyadari bahwa dalam penulisan ini jauh dari sempurna, oleh karena itu mengharapkan kritik dan saran demi kesempurnaan penelitian ini. Semoga penulisan ini dapat bermanfaat bagi yang membacanya, khususnya peminat ilmu bahan alam demi untuk perkembangan ilmu pengetahuan dalam bidang kimia.

Jakarta,

penulis

DAFTAR ISI

KATA PENGANTAR	iii
DAFTAR ISI	vi
DAFTAR GAMBAR	viii
DAFTAR TABEL	ix
BAB I PENDAHULUAN	1
BAB II TINJAUAN PUSTAKA	
2.1. Ramalina inflata (Hook., Tayl)	4
2.1.1. Morfologi Tanaman Ramalina inflata	5
2.1.2. Manfaat Tanaman Ramalina inflata	6
2.1.3. Kandungan Kimia dari Ramalina inflata	7
2.2. Uji Aktivitas Biologi	10
2.2.1. Mekanisme Kerja Anti Bakteri	11
2.2.2. Pengujian Aktivitas Anti Mikroba	11
2.2.3. Morfologi Bakteri Kuman Uji	12
BAB III METODOLOGI DAN HASIL PENGAMATAN	
3.1. Bahan – Bahan Penelitian yang digunakan	14
3.2. Pereaksi Penelitian yang digunakan	14
3.3. Alat – Alat penelitian yang digunakan	15
3.4. Tahapan Penelitian	15
3.4.1. Pengumpulan Sampel (contoh)	15
3.4.2. Prosedur dan Hasil Penapisan Fitokimia	16
a. Alkaloid	16
b. Flavanoid	16
c. Fenol	17
d. Saponin	17
e. Tanin	17
f. Sterol/Terpen	17
3.4.3. Prosedur dan Hasil Ekstraksi serta Isolasi	18
3.4.4. Data Spektroskopi	22
a. Senyawa A	23
b. Senyawa B	24
3.4.5. Prosedur dan Hasil Pengujian Aktivitas Biologi	26

BAB IV. PEMBAHASAN

4.1. Penapisan Fitokimia	32
4.2. Penentuan Struktur Molekul	32
4.2.1. Penentuan struktur molekul senyawa A	33
4.2.2. Penentuan struktur molekul senyawa B	40
4.3. Pengujian Aktivitas Biologi	46
4.4. Teori Lumut Kerak (Lichenes)	47
4.4.1. Karakteristik Lichenes	47
4.4.2. Klasifikasi Lichenes	49
4.4.3. Morfologi Lichenes	50
4.4.4. Habitat Lichenes	53

BAB V. KESIMPULAN DAN SARAN

5.1. Kesimpulan	56
5.2. Saran	56

DAFTAR PUSTAKA	58
-----------------------	-----------

DAFTAR TABEL

Tabel 1. Hasil uji Fitokimia Tumbuhan Ramalina inflate	18
Tabel 2. Konsentrasi Hambat Minimum kuman gram Negatif Eschericjia coli ATCC 25922	29
Tabel 3. Konsentrasi Hambat Minimum kuman gram Negatif Pseudomonas aeruginosa ATCC 27822	30
Tabel 4. Konsentrasi Hambat Minimum kuman gram Positif Staphylococcus aureus ATCC 25923	30
Tabel 5. Penentuan Zona Hambatan terhadap Staphylococcus aureus ATCC 25923	31
Tabel 6. Perbandingan data spektrum ^1H -NMR senyawa A yang diperoleh dari hasil isolasi dengan asam usnat yang diperoleh dari Budi Arman dan Layla Gani	36
Tabel 7. Perbandingan data spektrum ^{13}C -NMR senyawa A yang diperoleh dari hasil isolasi dengan asam usnat yang diperoleh dari Budi Arman dan Layla Gani	36
Tabel 8. Perbandingan data spektra ^{13}C -NMR asam usnat dari Usnea bayleyi, asam usnat dari Usnea dasypoga dan senyawa A	38
Tabel 9. Perbandingan sifat fisik dan bentuk fisik serta rotasi optik dan kelarutan asam usnat menurut literature asam usnat dari Usnea bayleyi dan senyawa A	39
Tabel 10. Perbandingan Pola Fragmentasi senyawa B, asam norstiktat dan asam stiktat	44

DAFTAR GANBAR

Gambar 1. Spesimen Herbarium Tumbuhan <i>Ramalina inflata</i>	7
Gambar 2. Kromatografi Lapis Tipis dari ekstrak n-heksana dan senyawa A	19
Gambar 3. Kromatografi Lapis Tipis dari ekstrak aseton dan senyawa B	21
Gambar 4. Skema pemisahan dan isolasi kandungan kimia dari <i>Ramalina inflata</i>	22
Gambar 5. Struktur asam usnat dari <i>Usnea bayleyi</i> dan senyawa A	37
Gambar 6. Pola fragmentasi senyawa A	39
Gambar 7. Biosintesis dari asam usnat melalui oksidasi Pengabugan Poliketida	40
Gambar 8. Struktur asam norstiktat dan struktur senyawa B Yang diusulkan	45
Gambar 9. Pola fragmentasi senyawa B	45

BAB I

PENDAHULUAN

Indonesia merupakan negara tropis yang kaya dengan berbagai macam tumbuhan. Jenis tumbuhan tersebut dibagi menjadi tumbuhan tingkat tinggi dan tumbuhan tingkat rendah. Tumbuhan ***Ramlina inflata*** adalah tumbuhan yang termasuk ke dalam kelompok Lichen dari Familia Ramalinaceae ¹, tergolong sebagai tumbuhan tingkat rendah. Tumbuhan ini banyak terdapat di pulau Sumatra, Jawa, Irian Jaya, Kalimantan dan tempat-tempat lain di dunia, seperti Amerika, Jepang, Malaysia, Eropa, Australia, dan Afrika ². Menurut kebiasaan nenek moyang kita, tumbuhan tersebut dapat digunakan sebagai obat tradisional, yang secara turun temurun dikenal dengan sebutan jamu.

Dari penelitian terdahulu ³, dapat diketahui bahwa kandungan kimia dari tumbuhan yang termasuk dalam kelompok Lichen tersebut, umumnya mempunyai khasiat sebagai anti mikroba dengan berbagai variasi bentuk kristalnya serta mempunyai ciri dan warna yang bermacam-macam.

Isolasi beberapa spesies dari golongan Lichen, di mana salah satunya adalah spesies ***Ramalina inflata*** ⁴, telah diketahui mengandung senyawa aktif, di antaranya : **Asam Usnat 1, Asam Divarikatat 2, Asam Sekikat 3, Asam Obfusatat 4, Kalsium Oksalat 5**. Untuk daerah atau negara sub tropis, juga telah dilakukan penelitian terhadap spesies ini dan dapat senyawa aktif, yaitu mengandung, ***Asam Divarikatat 2, Asam Nor-Divarikatat 6***,

Asam Norstiktat 7, Asam Sekikat 3 dan Asam Usnat 1. Senyawa-senyawa tersebut juga terdapat dalam spesies *R. minuscula*, *R. dilacerate*, *R. obfusata*, *R. subgeniculata*, *R. tasmanica*, *R. javanica*, dan *R. perpusilla*.

Sampai saat ini belum ada laporan penelitian yang lebih terperinci tentang kandungan kimia serta uji aktivitas biologu dari tanaman *R. inflata* pada kondisi negara-negara tropis, seperti Indonesia².

Dalam upaya menggali kekayaan alam Indonesia yang kaya akan berbagai macam tumbuhan dan usaha untuk mengetahui kegunaan serta uji aktivitas biologi dari senyawa kimia yang terkandung dalam suatu tumbuhan, maka penelitian ini dilakukan dengan tujuan untuk mengisolasi dan menentukan struktur molekul serta uji aktivitas biologi senyawa kimia yang terdapat di dalam tanaman *R. inflata*.

Tahap penelitian yang dilakukan dimulai dengan isolasi secara ekstraksi sinambung (continuous extraction) dari talus⁵ *R.inflata* yang telah dikeringkan dan dihaluskan, dengan menggunakan pelarut n-heksana, kemudian dilanjutkan dengan aseton. Dari masing-masing ekstrak kasar yang diperoleh, baik dari ekstrak kasar n-heksana dan aseton, dilakukan pemisahan melalui cara sederhana, tanpa melalui kolom kromatografi dan dimurnikan dengan cara re-kristalisasi. Untuk menguji kemurnian senyawa yang berhasil diisolasi, maka digunakan metode sederhana, yaitu dengan kromatografi lapis tipis (**KLT**). Untuk selanjutnya kristak yang didapat ditentukan **titik leleh** dan **putaran optis (- α)** nya.

Penentuan struktur molekul dilakukan berdasarkan data spektroskopi, antara lain; berdasarkan Spektra Infra Merah (**IR**), Massa (**MS**), Resonansi Magnit Inti ($^1\text{H-NMR}$ dan $^{13}\text{C-NMR}$), dan juga dilakukan yang hamoir mirip.

Komponen senyawa hasil isolasi yang telah murni, diuji aktivitas biologisnya terhadap beberapa jenis bakteri, baik **gram positif** dan **gram negatif** ⁶, yaitu *Escherichia coli* dan *Pseudomonas aeruginosa* mewakili gram negative, *Staphylococcus aureus* mewakili gram positif sedangkan sebagai pembanding dipakai **ampicillin**. Pemilihan ampicillin sebagai zat pembanding, disebabkan karena ampicillin mempunyai sifat anti mikroba golongan “**broad spectrum**”.

Genus *Ramalina* mempunyai **63 taxa (jenis)** ⁷ dan dari spesies *R. inflata* sendiri masih terdapat lagi beberapa sub spesies (variasi), sehingga untuk *R. inflata* dapat disebut sebagai kelompok *R. inflata*. Sedangkan untuk tumbuhan Lichen yang termasuk dalam **kelompok tipe Crustose ada 260 hingga 600 spesies** ⁸. Salah satu contoh dari penggunaan tumbuhan Lichen adalah usaha untuk memanfaatkan sebagai obat tradisional, yang biasanya dijual di toko-toko jamu.

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

2.1. *Ramalina Inflata*.

Ramalina inflata termasuk dalam kategori tumbuhan suku rendah, yang dikelompokkan ke dalam Lichen atau Lumut kerak. Tumbuhan ini dapat berkembang pada daerah dengan ketinggian hingga ± 1000 meter di atas permukaan laut, menyukai sinar matahari, lingkungan yang cukup kering (tidak begitu lembab) dan bebas polusi udara ⁴. Umumnya banyak ditemukan di hutan-hutan cukup rapat, tetapi masih bias ditembus sinar matahari dan tempat tumbuhnya menempel pada pohon, batu-batuan, tanah, pohon-pohon lapuk (epihifit / saprofit).

Tanaman inidibentuk dari 2 macam tumbuhan, yaitu **fungi (Mycobion)** dan **algae (phycobion)**. Kedua mikro organisme tersebut tumbuh secara bersama-sama dan **saling menguntungkan (symbiose mutualistic)** ⁹ atau salah satu mikro organismenya **lebih dominan dari yang lain (komensalisme)**.

Pertumbuhan dari tanaman tersebut sangat lambat dan mempunyai waktu hidup yang lama, sedangkan berkembang biakannya melalui spora dari masing-masing induknya yaitu fungi dan algae.

Adapun taksonomi dari tanaman ***R. inflata*** tersebut ialah ¹⁰;

Division	: Ascomycetes
Sub Divisio	: Ascomycotina

Ordo : Lecanorales
Familia : Ramalinaceae
Genus : Ramalina
Spesies : ***Ramalina inflata* Hook., & Tayl**

Tanaman ***Ramalina inflata*** yang termasuk dalam kelompok Lichen, mempunyai banyak manfaat bagi kehidupan manusia, selain sebagai obat antibiotic (lichen-fructose) ¹¹, juga dapat berguna sebagai bahan makanan untuk hewan, proses pewarnaan dan penyamakan, industry parfum, bahan dasar lakmus di dalam laboratorium kimia, dan yang paling utama dapat dijadikan sebagai indicator terhadap polusi lingkungan, di mana pada daerah-daerah yang banyak terdapat industry dan gas buangan kendaraan bermotor, maka tanaman ini tidak dapat hidup.

2.1.1 Morfologi Tanaman *Ramalina inflata* ¹.

Talus berbentuk benang, biasanya berwarna kuning kehijauan, berjumbai, mempunyai tempurung yang tumbuh dalam silinder empulur pusat dan melekat pada substrat, lazimnya bercabang-cabang dan jarang sekali berbentuk tunggal. Tangkai-tangkai talus toraks atau persegi dan sulur-sulur ranting berupa serabut. Lebih umum pada ***Ramalina inflata*** adalah batang berbentuk bulat kukuh, dan percabangannya banyak.

Kulit talus mengandung selaput tanduk, keras, terdiri dari hyfa yang melekat satu sama lain berdinding tebal, bersekat dan bercabang-cabang ¹². Lapisan empulur luar menyerupai sarang laba-laba, terbuat dari hyfa-hyfa yang berdinding tipis dan

letaknya tidak beraturan. Lapisan empulur dalam berkulit tanduk, yang merupakan untaian sentral yang kokoh. Untaian terdiri dari hyfa-hyfa tebal yang saling berlekatan satu sama lain dengan kuat.

Lapisan gonidia merupakan selubung silinder tertutup yang terjadi dari sel-sel protococcus dan terdapat di bawah kulit.

Soredia terlihat dalam jumlah banyak dan merupakan cabang-cabang apothecia yang biasanya berbentuk seperti lingkaran, serta kebanyakan tumbuh kesamping. Tanaman ini tumbuh di batang, pada tempat yang terbuka, agak jarang teetspi mudah terlihat. Hypothecia tipis bertulang rawan berwarna lebih muda dengan lapisan gonidia di bawahnya. Spora tidak berwarna, kecil menjorok atau hamper bundar, bersel satu dan berdinding tipis.

2.1.2. Manfaat Tanaman *Ramalina inflata*.

Tanaman *Ramalina inflata* termasuk ke dalam suku Lichen ⁸ (lumut kerak), yang salah satu dari golongan Lichen tersebut ialah tanaman kayu angina (*Usnea spp*), di mana mempunyai kandungan senyawa kimia yang mempunyai khasiat sebagai obat tradisional (jamu), yaitu dapat mengobati penyakit perut seperti diare, tinja berdarah, obat sariawan, masuk angina, kejang-kejang, sakit ginjal, nyeri perut dan kondisi lemah setelah bersalin, wasir serta gangguan haid ³. Adapun senyawa kimia yang berkhasiat dari *Usnea* tersebut salah satunya adalah **Asam usnat**, di mana pada tanaman *Ramalina inflata*, berdasarkan penelitian yang telah dilakukan oleh para ahli, juga mengandung asam usnat ⁴. Oleh karena itu pada dasarnya *Ramalina inflata* juga diduga

merupakan tanaman yang mempunyai manfaat yang sama dengan *Usnea spp* (tanaman kayu angin).

Cara penggunaan tanaman ini sebagai obat tradisional yaitu dengan merebus tanaman tersebut secara utuh (keseluruhan) dengan menggunakan air, kemudian diberi campuran tanaman obat tradisional lainnya seperti jahe, sirih, kunyit dan selanjutnya air rebusan tersebut diminum. Juga tanaman ini dapat dipakai untuk luluran (mandi rempah) bagi wanita dan berguna sebagai bedak untuk mempercantik dan menghaluskan kulit³.

Selain itu banyak manfaat lain dari tanaman ini, seperti untuk indicator pencemaran udara, pewarna, juga sebagai bahan dasar lakmus, pewangi dan lain-lain³.



Gambar 1. Specimen Herbarium Tumbuhan *Ramalina inflata*

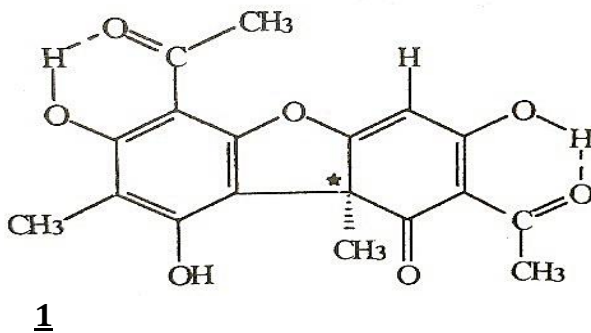
2.1.3. Kandungan Kimia dari *Ramalina inflata*

Dari beberapa spesies *Ramalina* lainnya, yang telah banyak dilaporkan antara lain⁴: *Ramalina minuscula* Nyl, see, *Ramalina*

dilacerate (Hoff) vain, Ramalina obfusata (Thies), sudah diketahui kandungan kimianya, antara lain ¹³;

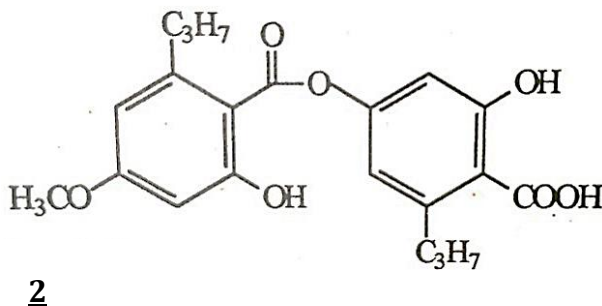
1. (+) - Asam Usnat (C₁₈H₁₆O₇)

Berupa kristal kuning dan merupakan komponen terbesar dari spesies *Usnea* dan *Ramalina*, ± sekitar 60% mempunyai titik leleh 203-204°C, putaran optik spesifik $[\alpha]_D^{20} = + 495^\circ$ (CHCl₃), larut dalam benzene, kloroform, etanol dan aseton. Struktur molekul senyawa tersebut:



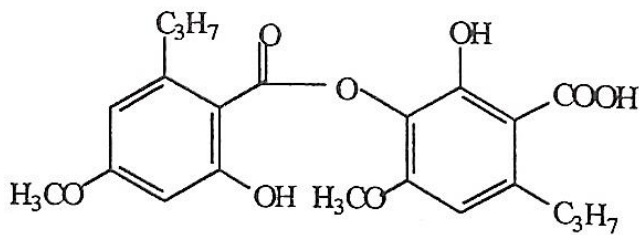
2. Asam Divarikatat (C₂₁H₂₄O₇)

Mempunyai titik leleh 137 – 138°C, berbentuk jarum, larut dalam benzene dan struktur molekulnya :



3. Asam Sekikat (C₂₂H₂₆O₈)

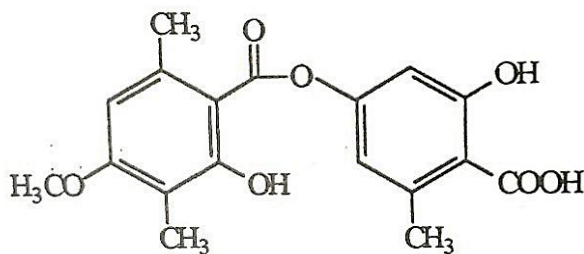
Mempunyai titik leleh. 150 - 151°C, berbentuk Kristal, larut dalam aseton dan struktur molekulnya :



3

4. Asam Obfusatat ($C_{18}H_{18}O_7$)

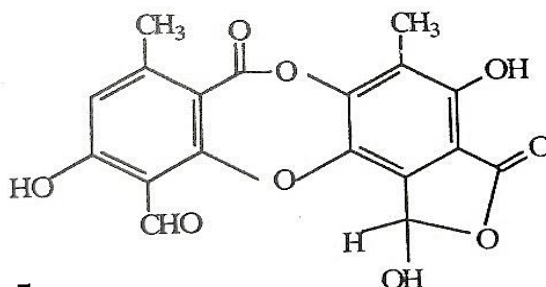
Mempunyai titik leleh 208 - 209°C, berbentuk Kristal, larut dalam aseton dan struktur molekulnya :



4

5. Asam Norsiktat ($C_{18}H_{22}O_9$)

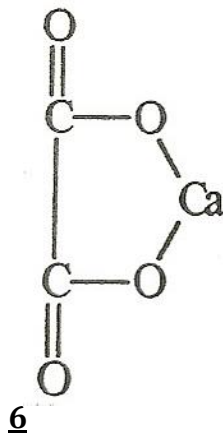
Mempunyai titik leleh 286 - 287°C, dalam (aseton - air), Kristal berwarna putih dan strukturnya :



5

6. Kalsium Oksalat

Untuk *Ramalina inflata* yang tumbuh di daerah sub tropis dan tropis belum pernah dilaporkan. Oleh karena itu cara mengisolasi senyawa kimia tersebut merupakan suatu permasalahan yang cukup kompleks dan memerlukan ketelitian di dalam pelaksanaannya.



2.2. Uji Aktivitas Biologi

Uji aktivitas biologi ¹⁴ atau sering disebut sebagai bioassay, diartikan sebagai suatu uji atau test, di mana kadar dan cara kerja suatu bahan diterra dengan reaksi suatu organisme hidup. Terdapat beberapa macam uji aktivitas biologi, yaitu dengan **metode dilusi** dan **metode pathogen**. Dari metode yang diharapkan dapat memberikan respon untuk menghambat perkembangan suatu organisme hidup, yang disebut sebagai **mikroba patogen**, yang mempunyai efek negatif terhadap tubuh manusia dan akan menimbulkan penyakit. Berdasarkan hal tersebut, sekarang ini telah banyak beredar obat-obatan anti bakteri, baik dalam sediaan modern maupun tradisional.

Ramalina inflata merupakan salah satu tumbuhan yang oleh penduduk setempat, banyak digunakan sebagai pencampur jamu godogan, untuk mengobati diare, batuk, kudis, dan lain-lain. Dalam hal ini belum ada penelitian lebih lanjut mengenai manfaat tumbuhan tersebut dari segi farmakologinya. Oleh karena itu untuk membuktikan khasiat dari tumbuhan ini dilakukan penelitian secara mikrobiologi terhadap beberapa bakteri penyebab penyakit tersebut di atas.

Penelitian dilakukan secara **in vitro** terhadap bakteri ***Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*** dan ***Pseudomonas aeruginosa***. Anti bakteri adalah semua senyawa yang mempunyai daya hambat pertumbuhan atau membunuh bakteri. Berdasarkan daya kerjanya, bakteri dibedakan menjadi ¹⁵ :

a) Bakteriostatika.

Anti bakteri yang mempunyai cara kerja menghambat pertumbuhan dan perkembangan biakan bakteri. Perkembang biakan akan berlangsung kembali, bila kontak dengan zat yang dapat menghambat dihentikan.

b) Bakterisida

Anti bakteri yang mempunyai kekuatan untuk mikro organisme. Efek tersebut memberikan sasaran, agar mikro organisme tidak dapat bereproduksi kembali, walaupun kontak dengan zat pembunuh dihentikan.

2.2.1. Mekanisme Kerja Anti Bakteri ¹⁶.

Mekanisme kerja anti bakteri dapat dibedakan menjadi 4 macam :

- a) Denaturasi protein, yaitu terjadinya gangguan terhadap struktur tersier suatu protein pada sel bakteri, yang disebabkan oleh faktor fisis atau kimia.
- b) Gangguan selaput atau dinding sel, sehingga menyebabkan kerusakan sel mikroba.
- c) Menghambat metabolisme sel mikroba.
- d) Menghambat sintesis asam nukleat mikroba.

Selain itu dikenal mekanisme antagonis kimia, yaitu gangguan suatu unsur terganggu ¹⁶.

2.2.2. Pengujian Aktivitas Anti Mikroba.

Metode yang digunakan dalam pengujian anti mikroba, berdasarkan prinsipnya terbagi atas dua kelompok yaitu ¹⁷ :

a) Metode difusi :

Metode uji dilakukan dengan menggunakan cakram kertas atau silinder baja bahan karat. Zat uji ditentukan aktivitasnya berdasarkan kemampuan berdifusi pada lempeng agar yang diinokulasi dengan kuman uji. Dasar pengamatan adalah dengan melihat zona hambatan yang terbentuk pada pertumbuhan kuman di sekeliling zat uji, dengan perbandingan angka-angka yang dihasilkan.

b) **Metode dilusi :**

Pada metode ini yang digunakan adalah modifikasi dari metode **Kirby-Bauer**. Zat uji dicampur dengan medium, yang kemudian diinokulasikan dengan kuman uji. Pada uji aktivitas ini, juga ditentukan uji **KHM**, di mana diamati konsentrasi terkecil dari zat uji yang masih dapat menghambat pertumbuhan kuman.

2.2.3. Morfologi Bakteri Kuman Uji.

a) ***Eshcerichia coli***

Bakteri ini tergolong bakteri gram negatif, berbentuk batang pendek dengan ukuran 3-5 μ dan pada pembedahan padat, koloni bakteri berbentuk bulat konveks, halus dengan tepi nyata, memiliki flagel, tetapi ada juga yang tidak. Adapun sistematika bakteri ini berdasarkan filogenetiknya sebagai berikut ¹⁴.

Divisio	: Thallaphyta
Klas	: Schizomycetes
Ordo	: Eubacteriales
Familia	: Enterobacteriaceae
Genus	: Escherechia
Spesies	: <i>Escherichia coli</i>

b) ***Staphylococcus aureus***

Tergolong bakteri gram positif dari familia Micrococcaceae, berbentuk bulat dengan diameter 0,8 – 1,5 μ , sering terlihat bergerombol dan tersusun dalam kelompok-kelompok tidak

teratur seperti buah anggur ¹⁵. Bakteri ini tidak bergerak dan tidak membentuk spora, bersifat patogen dan dapat tumbuh dalam keadaan aerob maupun anaerob. Pada manusia dapat menyebabkan penyakit kulit, paru-paru menginitis dan diare. Adapun sistematika bakterii ini ialah ¹⁴ :

Divisio	: Thallophyta
Klas	: Schizomycetes
Ordo	: Eubacteriales
Familia	: Micrococcaceae
Genus	: Staphylococcus
Spesies	: <i>Staphylococcus aureus</i>

c) *Pseudomonas aeruginosa*.

Bakteri ini termasuk golongan bakteri gram negatif dan berbentuk batang dengan ukuran 0,5 – 4 μ . sebagian besar mempunyai alat gerak (flagel) tunggal. Berupa flora normal dalam usus manusia =, bias juga dijumpai di kulit. Pada manusia dapat menimbulkan penyakit perut.

Adapun sistematika bakteri ini berdasarkan filogenetiknya sebagai berikut ¹⁴ :

Divisio	: Thallophyta
Klas	: Schizomycetes
Ordo	: Eubacteriales
Familia	: Pseudomonadaceae
Genus	: Pseudomonas
Spesies	: <i>Pseudomonas aeruginosa</i>

BAB III

METODOLOGI DAN HASIL PENGAMATAN

3.1. Bahan-bahan Penelitian yang digunakan meliputi :

- Tanaman *Ramalina inflata*
- n-Heksana
- Kloroform
- Aseton
- Etanol
- Etil Asetat
- Piridin
- Pelat silica gel untuk KLT
- Pereaksi untuk penapisan Fitokimia
- Asam asetat

3.2. Pereaksi Penelitian yang digunakan meliputi :

- Dragendorf
- Mayer
- HCl 10% v/v
- Amil alkohol
- Pita Magnesium
- Larutan NaOH 1N
- Larutan gelatin
- Larutan FeC₃ 1%
- Petroleum eter
- H₂SO₄ pekat
- Air panas

3.3. Alat-alat Penelitian yang digunakan meliputi :

- Alat-alat gelas
- Alat evaporator vakum putar
- Fisher melting point apparatus (Electrothermal Serial No.5659)
- Spektrometer Massa
- Spektrometer NMR
- Timbangan listrik
- Pemanas listrik
- Lampu UV
- Soklet dan perangkainya
- Spektrofotometer IR

3.4. Tahapan Penelitian

Tahapan penelitian yang dilakukan meliputi :

- Pengumpulan sampel (contoh)
- Penapisan Fitokimia
- Ekstraksi dan Isolasi
- Penentuan struktur molekul dengan menggunakan data sifat fisika dan data spektroskopi
- Pengajuan aktivitas biologi

3.4.1. Pengumpulan Sampel (contoh)

Tanaman *Ramalina inflata* diambil dari Taman Nasional Seblat, Kerinci di Sumatra (Propinsi Jambi), sebanyak 3,5 kg. Sampel basah yang diperoleh diidentifikasi pada Herbarium Bogoriense. Tanaman tersebut selanjutnya

dibersihkan dan dikeringkan dengan cara diangin-anginkan di udara terbuka pada wadah yang bersih. Setelah kering tanaman tersebut digunting kecil-kecil, kemudian dihaluskan dengan alat blender, kemudian bubuk ditimbang dan diambil sesuai kebutuhan yang diinginkan.

3.4.2. Prosedur dan Hasil Penapisan Fitokimia

Tujuan dari penapisan fitokimia secara umum dan kasar adalah untuk mengetahui senyawa apa saja yang mungkin terdapat dalam suatu tanaman. Pengujian dilakukan terhadap adanya kandungan **alkaloid, flavonoid, fenol, saponin, tannin,, dan sterol/terpen**. Prosedur masing-masing pengujian adalah sebagai berikut ¹⁸ :

a) Alkaloid

Serbuk simplesia sebanyak 2 g dilembabkan dengan 5 mL ammoniak 25% dan digerus dalam mortir. Selanjutnya ditambahkan 20 mL CHCl_3 dan diaduk kuat-kuat, selanjutnya disaring. Filtrat dibagi 2, yaitu larutan A dan B. Larutan A ditetaskan pada kertas saring kemudian disemprot dengan pereaksi Dragendorff. Larutan B diekstraksi dengan 10 mL larutan HCl 10% v/v. Ke dalam 5 mL larutan B ditambahkan beberapa tetes pereaksi Mayer. Dari uji alkaloid tidak menunjukkan perubahan warna dan terjadinya endapan, sehingga dapat disimpulkan bahwa terhadap tumbuhan *Ramalina inflata* tidak mengandung alkaloid.

b) Flavonoid

Serbuk sebanyak 1 g ditambah dengan 100 mL air panas, selanjutnya dididihkan selama 5 menit dan disaring. Ke dalam 5 mL filtrat ditambahkan pita/lempeng magnesium (Mg) dan 1 mL HCl pekat serta 5 mL amil alkohol, kemudian dikocok dan dibiarkan memisah. Setelah terjadi pemisahan tidak terlihat adanya warna merah/kuning/jingga pada lapisan amil alkohol. Hal ini menunjukkan bahwa uji flavonoid adalah negatif.

c) Fenol

Menggunakan larutan FeCl_3 yang diteteskan sebanyak 3 tetes ke dalam 5 mL larutan ekstrak kasar berwarna coklat muda kekuning-kuningan yang telah disaring, mengakibatkan perubahan warna menjadi merah keungu-unguan. Hal ini menunjukkan bahwa uji fenol adalah negatif.

d) Saponin

serbuk sebanyak 1 g ditambahkan dengan 100 mL air panas. Kemudian dididihkan selama 5 menit dan disaring. 10 mL filtrat dikocok vertikal selama 10 detik dan dibiarkan selama 10 menit. Pada saat pengocokan terbentuk busa yang stabil pada selang waktu 10 menit, sehingga dapat disimpulkan bahwa uji saponin adalah positif.

e) Tanin

Serbuk sebanyak 1 g ditambah dengan 100 mL air panas, kemudian dididihkan selama 5 menit dan disaring. Filtrat dimasukkan ke dalam 2 tabung reaksi, masing-masing sebanyak 5 mL. pada tabung reaksi pertama ditambahkan beberapa tetes

larutan FeCl_3 1% sedangkan pada tabung reaksi kedua ditambahkan beberapa tetes larutan gelatin. Pada penambahan larutan FeCl_3 1% terlihat adanya warna hijau muda dan pada penambahan gelatin terbentuk endapan putih, sehingga dapat disimpulkan bahwa uji tannin adalah positif.

f) Sterol/Terpen

Serbuk sebanyak 1 g dimaserasi dengan 20 mL petroleum eter selama 2 jam, kemudian disaring. Filtrat yang diperoleh diambil sebanyak 5 mL, selanjutnya diuapkan dalam cawan penguap. Ke dalam residu hasil penguapan ditambahkan 2 tetes anhidrida asetat dan 1 tetes H_2SO_4 pekat. Pada uji ini menunjukkan terjadinya warna merah/hijau/biru lalu violet. Hal ini menyatakan bahwa uji sterol atau terpen adalah positif,

Keseluruhan hasil penapisan fitokimia dapat dilihat kembali di dalam Tabel berikut ini :

Tabel 1

Hasil Uji Fitokimia Tumbuhan *Ramalina inflata*

Jenis senyawa	Hasil	Pengamatan
Alkanoid	Negatif	Tidak ada perubahan yang berarti.
Flavonoid	Negatif	Tidak ada perubahan warna.
Fenol	Positif	Ada perubahan warna, merah ke ungu-unguan.
Saponin	Positif	Terbentuk busa stabil, seperti sabun.
Tanin	Positif	Ada endapan berwarna putih.
Sterol/Terpen	Positif	Ada perubahan warna dari merah/hijau/biru lalu violet

3.4.3. Prosedur dan Hasil Ekstraksi Serta Isolasi.

Tanaman *Ramalina inflata* sebanyak 180 g dalam keadaan kering dan halus, diekstraksi secara sinambung dengan menggunakan alat soklet dan pelarut yang digunakan adalah n-heksana untuk selama ± 30 jam. Kemudian ekstrak yang didapat, diuapkan pelarutnya dengan menggunakan evaporator vakum putar, sehingga diperoleh ekstrak kasar n-heksana sebanyak 3,5 g.

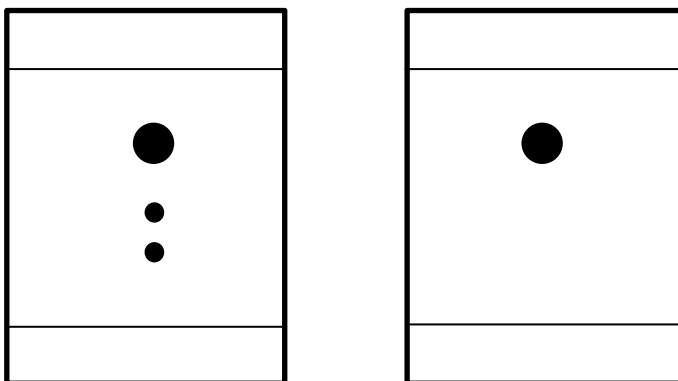
Serbuk bebas ekstraksi dengan menggunakan pelarut n-heksana dikeringkan, kemudian dilakukan ekstraksi sinambung kembali dengan menggunakan pelarut aseton selama ± 30 jam. Ekstrak yang dihasilkan diuapkan, selanjutnya dengan evaporator vakum putar, sehingga diperoleh ekstrak kasar aseton sebanyak 4,2 g.

Maksud dari penggunaan ekstraksi dengan dua pelarut yang berbeda kepolarannya, adalah untuk memisahkan dan mengisolasi kandungan kimia tanaman *Ramalina inflata* yang berbeda kepolarannya. Sehingga diharapkan akan memudahkan di dalam proses pemisahan untuk mendapatkan zat murninya.

Untuk memperoleh senyawa kimia murni dari masing-masing ekstrak yang diperoleh, maka dilakukan pemisahan serta pemurnian. Adapun pemisahan masing-masing ekstrak kasar tersebut sebagai berikut :

a. Ekstrak kasar n-heksana

Ekstrak kasar n-heksana diuji dengan **kromatografi lapis tipis**²⁰, dengan Maksud untuk mengetahui jumlah komponen kimia yang ada dalam ekstrak tersebut. Kromatografi lapis tipis dilakukan dengan menggunakan fasa gerak (eluen) n-heksana – etil asetat 6:3, dan sebagai penampak noda digunakan campuran 10% H_2SO_4 pekat di dalam methanol. Uji kromatografi lapis tipis terhadap ekstrak n-heksana memberikan hasil adanya 3 noda dan dari ketiga noda tersebut yang memperlihatkan intensitas warna yang kuat hanya 1 noda saja. Hal ini menunjukkan bahwa satu senyawa kimia diharapkan dapat dipisahkan dan dimurnikan.



Gambar 2. Kromatografi lapis tipis dari **Ekstraks n-heksana dan senyawa A**

Pemisahan komponen dari ekstrak n-heksana ini dilakukan tanpa melalui kolom kromatografi, karena dari penambahan kembali ekstrak n-heksana dengan n-heksana dan CHCl_3 (1:1) timbul suatu kristal yang belum murni dan masih tercampur dengan zat seperti minyak. Rekristalisasi dilakukan

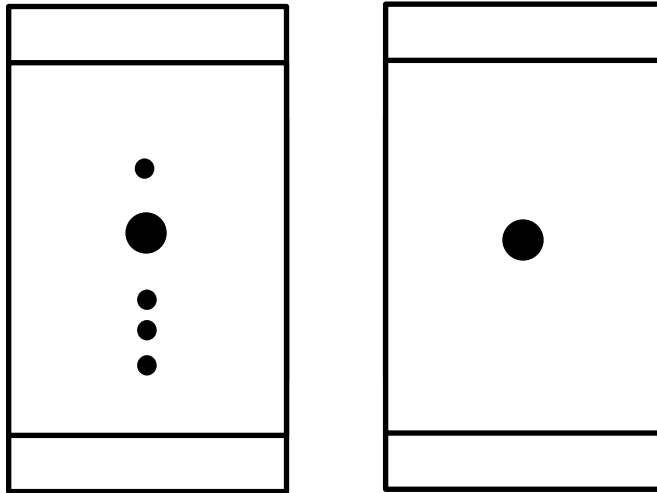
dengan menggunakan aseton panas, dari larutan lewat jenuh tersebut didinginkan secara perlahan-lahan, sehingga didapat Kristal murni seperti jarum warna kuning terang yang selanjutnya disebut sebagai senyawa A, diperoleh sebanyak 450 mg dengan $R_f = 0,4$ pada KLT (eluen n-heksana : etil asetat = 6:3). Dari pengukuran titik leleh diperoleh data titik leleh Kristal kuning tersebut $203,5 - 203,8^\circ\text{C}$. selanjutnya dilakukan pengukuran-pengukuran dengan spektrometer : IR, NMR, dan MS, terhadap Kristal murni. Sifat fisik Kristal, terutama kelarutannya adalah baik, di dalam CHCl_3 dan juga dalam aseton panas.

b. ***Ekstrak Kasar Aseton***

Ekstrak kasar aseton diuji dengan **Kromatografi Lapis Tipis**²⁰, dan terlihat adanya 5 bercak noda dari ekstrak tersebut. KLTT dilakukan dengan menggunakan fasa gerak CHCl_3 : methanol = 7 : 3, dan untuk penampak noda digunakan campuran 10% H_2SO_4 dalam metanol 90% dibantu pengamatan melalui lampu U.V. Dari intensitas warna noda, maka ada 2 noda yang cukup besar untuk dicoba dipisahkan dan dimurnikan.

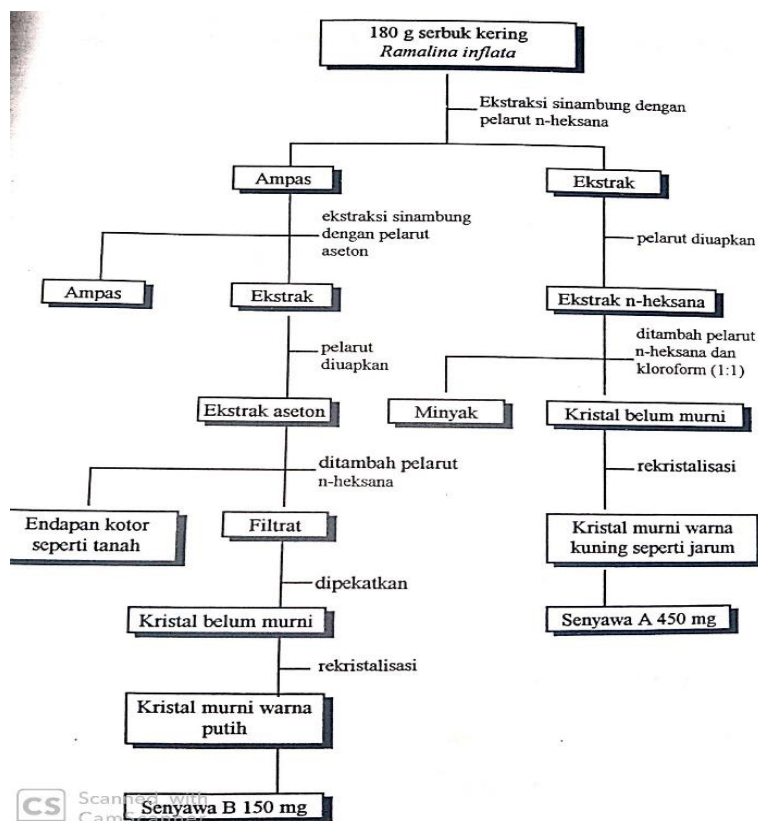
Pemisahan komponen dilakukan tanpa melalui kolom kromatografi, oleh karena larutan ekstrak aseton didalam n-heksana membentuk endapan kotor. Endapan dipisahkan dipekatkan kembali lalu dihasilkan suatu kristal putih yang belum bersih, kemudian dilakukan rekristalisasi menggunakan aseton panas dann didapatkan Kristal putih murni yang selanjutnya disebut sebagai senyawa B, diperoleh sebanyak 150 mg. Pada kromatografi lapis tipis dengan CHCl_3 : Metanol, 7:3

sebagai eluen, didapat $R_f = 0,35$ dan titik lelehnya $262 - 263^\circ\text{C}$, larut dalam aseton panas dan air, juga larut dalam Piridin, Berbentuk Kristal dan berwarna putih.



Gambar 3. Kromatografi Lapis Tipis dari **ekstrak aseton** dan **senyawa B**

Skema ekstraksi dan isolasi senyawa kimia dari tanaman *Ramalina inflata* dapat dilihat pada gambar berikut :



Gambar 4. Skema pemisahan dan isolasi kandungan kimia dari *R.inflata*

3.4.4. Data Spektroskopi

Terhadap senyawa murni yang diperoleh pada proses ekstraksi dan isolasi yaitu kristal kuning (A) dan kristal putih (B), dilakukan pengukuran dengan spectrometer infra merah (IR), magnetik inti proton dan karbon (^1H -NMR dan ^{13}C -NMR), serta massa (MS). Data spektroskopinya adalah sebagai berikut:

a. *Senyawa A*

Infra Merah

Spektroskopi infra merah (IR), metoda KBr Pelet, memberikan pita serapan pada daerah-daerah dengan bilangan gelombang ($\bar{\nu}$, cm^{-1}) :

3450	3150	3040	2950
1690			
1643	1625	1450	1390
1140			

Spectrum infra merah senyawa A dapat dilihat pada lampiran 2.

Resonansi Magnetik Inti Proton ($^1\text{H-NMR}$)

$^1\text{H-NMR}$ dalam CDCl_3 , 300 MHz, δ dalam ppm :

13,3 (s,1H)	11,02 (s,1H)	5,97 (s,1H)
2,67 (s,3H)	2,65 (s,3H)	2,09 (s,3H)
1,75 (s,3H)	1,60 (s,3H)	

Spectrum resonansi magnetic inti proton senyawa A dapat dilihat pada lampiran 3.

Resonansi magnetik inti karbon ($^{13}\text{C-NMR}$)

$^{13}\text{C-NMR}$ dalam aseton $-\text{d}_6$, 75,469 MHz δ dalam ppm :

201,7	200,9	198,1	191,6
179,3			

162,5	156,8	155,2	107,2
106,2			
104,9	101,2	98,3	58,5
31,5			
31,1	27,9	7,5	

Spectrum resonansi magnetik inti karbon senyawa A dapat dilihat pada lampiran 4.

^{13}C -NMR, DEPT, δ dalam ppm :

98,3	31,5	31,3	27,9
7,5			

Data spectrum DEPT senyawa A dapat dilihat pada lampiran 5.

Massa (MS)

Massa, dalam aseton, m/z :

344 M ⁺ (65%)	260 (67%)	233 (100%)
--------------------------	-----------	------------

Spectrum massa senyawa A dapat dilihat pada lampiran 6.

b. Senyawa B

Infra Merah.

Spektrokopi infra merah (IR), metode KBr Pelet, memberikan pita serapan pada daerah – daerah dengan bilangan gelombang ($\bar{\nu}$, cm⁻¹) :

3427	2930	1763	1656	1571	1445	1385
------	------	------	------	------	------	------

Spektrum infra merah senyawa B dapat dilihat pada lampiran 7.

Resonansi Magnetik Inti Proton ($^1\text{H-NMR}$)

$^1\text{H-NMR}$ dalam aseton- d_6 , 300 MHz, δ dalam ppm :

12,27 (s,1H)	10,63 (s,1H)	10,58 (s,1H)
7,09 (d,1H)	6,98 (s,1H)	3,99 (s,1H)
2,52 (s,3H)	2,27 (s,2H)	2,09 (s,3H)

Spektrum magnetik inti proton senyawa B, (lihat pada lampiran 8).

Resonansi Magnetik Inti Karbon ($^{13}\text{C-NMR}$)

$^{13}\text{C-NMR}$ dalam aseton- d_6 , 75,469 MHz δ dalam ppm :

192,7	186,6	166,3	162,4
160,7			
158,8	148,1	137,4	135,9
123,3			
120,8	117,4	114,4	112,8
109,6			
95,8	52,6	21,5	9,6

Spektrum resonansi magnetik inti karbon senyawa B dapat dilihat pada lampiran 9.

$^{13}\text{C-NMR}$, DEPT, δ dalam ppm :

186,6	112,8	98,1	52,6	21,5	9,6
-------	-------	------	------	------	-----

Data spektrum DEPT senyawa B dapat dilihat pada lampiran 10.

Massa (MS)

Massa, dalam aseton, m/z :

386 M ⁺ (27%)	372 (82%)	354 (75%)
179,0 (56%)	177 (54%)	55 (100%)

Spektrum massa senyawa B dapat dilihat pada lampiran 11.

3.4.5. Prosedur dan Hasil Pengujian Aktivitas Biologi

A. *Prosedur dan Hasil Pengamatan Uji Pendahuluan Aktivitas Biologi*

Uji pendahuluan dilakukan untuk mengetahui adanya hambatan dan luas hambatan yang dapat diamati terhadap kuman uji.

Percobaan dilakukan dengan penentuan konsentrasi hambat minimum (**KHM**) dan **zona hambatan** ²⁰, terhadap bakteri yang mewakili kuman gram negatif dan kuman gram positif. Adapun kuman yang mewakili gram negatif adalah *Escherichia coli* ATCC 25922 dan *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27822 dan mewakili gram positif adalah *Staphylococcus aureus* ATCC 25923.

Media percobaan menggunakan **Muller Hinton Agar** dan **Nutrient Broth** ¹⁶. Sedang zat uji yang dipakai berasal dari ekstrak n-heksana dan ekstrak aseton, serta senyawa A dan senyawa B.

Pengamatan dilakukan dengan tiga kali pengulangan, sampai didapat data yang paling baik.. Hasil pengamatan

dapat dilihat pada Tabel 2, hingga Tabel 5, sedangkan sebagai antibiotik pembanding digunakan ampicillin.

B. Prosedur dan Hasil Pengamatan Uji Aktivitas Anti Bakteri.

- **Prosedur Uji Konsentrasi Hambat Minimum.**

Metode yang digunakan adalah Modifikasi Metode **Kirby Bauer** ¹⁶.

Penyimpanan inokulum suspense bakteri *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* dan *Staphylococcus Aureus*. Diambil 1 ose bakteri, ditanam pada nutrient agar, selanjutnya di inkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C. dibuat suspensi kuman dalam larutan NaCl fisiologis sampai diperoleh kekeruhan sama dengan skala McFarland-3 atau 10^9 kuman/mL. Berikutnya diencerkan dengan NaCl fisiologis sampai diperoleh pengenceran 10^6 kuman/mL.

1. Senyawa yang diuji ditimbang 25 mg, lalu ditambahkan 1 tetes pelarut n-heksana (untuk senyawa A) dan piridin (untuk senyawa B), lalu masing – masing diencerkan dengan Nutrient Broth untuk senyawa A dan Aquadest steril untuk senyawa B, sehingga diperoleh urutan pengenceran 1000,000; 250,000; 125,000; 62,500; 31,250 dan 15,625 µg/mL. Sterilisasi dilakukan dengan bakteri filter atau autoklav. Untuk ekstrak, pengenceran dilakukan dengan menggunakan Nutrient Broth untuk masing – masing ekstrak.

2. Pada microplate whell 24, dimasukkan ke dalam masing – masing lubang 0.8 mL Nutrient Broth dan 0,1 mL kemudian di masukkan masing – masing larutan uji secara berurutan dan larutan blanko sebanyak 0.1 mL. Di kocok dengan alat shaker selama 24 jam pada temperature ruang. Selanjutnya diamati hasil penguji dengan memberi tanda (-) untuk larutan jernih atau tidak ada pertumbuhan kuman dan tanda (+) untuk larutan keruh atau ada pertumbuhan kuman. KHM ditentukan dari konsentrasi terendah larutan, yang menghambat pertumbuhan kuman.

- **Prosedur Uji Zona Hambatan**

Metode uji dilakukan dengan **cakram kertas/silinder baja tahan karat**.

1. Di buat suspense kuman seperti pada **penyiapan inokulum prosedur uji konsentrasi hambat minimum** (prosedur no.1) diatas.
2. Di buat pengenceran senyawa uji, sedangkan untuk ekstrak langsung ditetaskan 0,1 mL dengan mikro pipet. Sterilisasi dengan bakteri filter atau autoklaf.
3. Di buat lapisan dasar pada cawan petri dengan menggunakan nutrient agar sebanyak 15 mL, lalu dicairkan 4 mL media **Muller Hinton Agar** pada temperature 40 – 45°C, tambahkan 1 mL suspense kuman, kocok hingga homogen, taburkan di atas lapisan dasar dan biarkan membeku. Letakkan 7 buah silinder

baja tahan karat steril. Teteskan secara berurutan, larutan uji hasil pengenceran dan larutan blanko masing – masing 20 – 50 μ L.

4. Di inkubasi pada temperatur 37°C selama 18 – 24 jam.
5. Di ukur zona yang terbentuk.

Komposisi Media Muller Hinton Agar pH 7.1 \pm 0.1.

- Beef, infusion from beef heart 300 g
- Bacto Casamino Acid Technical 17,5 g
- Starch 1,5 g
- Bacto Agar 17 g

Nutrient Broth

- Pepton from meat 5 g
- Meat extract 3 g

Tabel. 2
Konsentrasi Hambat Minimum Kuman gram negatif
***Escherichia coli* ATCC 25922.**

Zat uji	Konsentrasi dalam ppm						
	1	2	3	4	5	6	7
Ampicillin	-	+	+	+	+	+	+
Ekstrak n-heksana	+	+	+	+	+	+	+
Ekstrak aseton	+	+	+	+	+	+	+
Senyawa A	+	+	+	+	+	+	+
Senyawa B	+	+	+	+	+	+	+

Keterangan:

Untuk ampicillin konsentrasi : (1). 64 $\mu\text{g/mL}$, (2). 32 $\mu\text{g/mL}$, (3). 16 $\mu\text{g/mL}$, (4). 8 $\mu\text{g/mL}$, (5). 4 $\mu\text{g/mL}$, (6). 2 $\mu\text{g/mL}$, (7). 1 $\mu\text{g/mL}$.

Senyawa A dan B : (1). 1000,000 $\mu\text{g/mL}$, (2). 500,000 $\mu\text{g/mL}$, (3). 250,000 $\mu\text{g/mL}$, (4). 125,000 $\mu\text{g/mL}$, (5). 62,500 $\mu\text{g/mL}$, (6). 31,250 $\mu\text{g/mL}$, (7). 16.625 $\mu\text{g/mL}$.

Ekstrak n-heksana dan aseton : (1) tanpa pengenceran, (2) diencerkan 2 kali, (3) diencerkan 4 kali, (4). Diencerkan 8 kali, (5) diencerkan 16 kali, (6) diencerkan 32 kali, (7) diencerkan 64 kali.

Cara pengenceran ekstrak:

- (1) 0,1 mL ekstrak diambil dengan mikropipet diteteskan langsung
- (2) Pengenceran 2 kali, 1 mL ekstrak + 1 mL Nutrient Broth dicampur, lalu diambil 0,1 mL dan diteteskan pada media kuman
- (3) Dari sisa 1,9 mL ekstrak, diambil lagi 1 mL + 1 mL Nutrient Broth, lalu diambil lagi
- (4) 0,1 mL dan diteteskan pada media kuman.
- (-) Tidak ada perubahan
- (+) Ada pertumbuhan kuman

Tabel. 3
KHM terhadap kuman gram negatif
Pseudomonas aeruginosa ATCC 27822.

Zat uji	Konsentrasi dalam ppm						
	1	2	3	4	5	6	7
Ampicillin	-	-	+	+	+	+	+
Ekstrak n-heksana	+	+	+	+	+	+	+
Ekstrak aseton	+	+	+	+	+	+	+
Senyawa A	+	+	+	+	+	+	+
Senyawa B	+	+	+	+	+	+	+

Keterangan : Konsentrasi sama dengan di atas.

(-) Tidak ada pertumbuhan kuman .

(+) Ada pertumbuhan kuman.

Tabel. 4
KHM terhadap kuman gram positif
Staphylococcus aureus ATCC 25923.

Zat uji	Konsentrasi dalam ppm						
	1	2	3	4	5	6	7
Ampicillin	-	-	-	-	-	+	+
Ekstrak n-heksana	-	+	+	+	+	+	+
Ekstrak aseton	-	-	-	-	-	-	+
Senyawa A	-	+	+	+	+	+	+
Senyawa B	+	+	+	+	+	+	+

Tabel. 5
Penentuan Zona Hambatan terhadap
***Staphylococcus aureus* ATCC 25923**

Zat uji	Konsentrasi dalam ppm						
	1	2	3	4	5	6	7
Ampicillin	1.65	1.05	0.98	-	-	-	-
Ekstrak n-heksana	2.03	0.740	0.610	-	-	-	-
Ekstrak aseton	1.625	0.850	0.785	0.640	-	-	-
Senyawa A	0.975	-	-	-	-	-	-
Senyawa B	-	-	-	-	-	-	-

Keterangan :

Diameter zona dalam cm.

(-) tanda tersebut menyatakan tidak ada zona hambatan
atau tanda (-) menyatakan lebih kecil dari 0.6 cm.

BAB IV

PEMBAHASAN

4.1. Penapisan Fitokimia

Penapisan fitokimia yang dilakukan terhadap talus *Ramalina inflata* menunjukkan bahwa tanaman tersebut mengandung senyawa fenol, saponin, tanin, dan sterol/terpen ¹³. Dari hasil uji tersebut memberikan indikasi yang paling jelas adalah pada uji fenol. Hal ini menunjukkan bahwa tanaman tersebut mengandung senyawa turunan fenol.

4.2. Penentuan Struktur Molekul

Penentuan struktur molekul senyawa A dan senyawa B, dilakukan dengan menganalisis dan spektroskopi: infra merah, ultra violet, resonansi magnetic inti-proton (¹H-NMR), resonansi magnetic into-karbon (¹³C-NMR), DEPT, dan massa (MS) ²¹.

Spektroskopi infra merah ²² diperlukan untuk menentukan jenis gugus fungsi yang terdapat dalam molekul yang dianalisis. Spektrum resonansi magnetic inti proton untuk menentukan letak dan jumlah proton dalam molekul serta menentukan gugus yang berdekatan dengan setiap atom hydrogen ²³. Spectrum resonansi magnetic inti karbon berguna untuk menentukan jumlah atom karbon dan jenis karbon yang berbeda posisi dalam molekul yang dianalisis, sedangkan spektroskopi massa diperlukan untuk menentukan berat molekul serta pola fragmentasi dari masing – masing molekul.

4.2.1. Penentuan Struktur Molekul Senyawa A

Senyawa A berasal dari fraksi n-heksana berupa Kristal kunung mengkilat seperti jarum dengan titik leleh 203,5 – 203,8°C. pengukuran dengan spektrofotometer infra merah (lampiran 2) memberikan pita serapan pada daerah bilangan gelombang ($\bar{\nu}$ cm⁻¹) sebagai berikut:

3450, merupakan vibrasi ulur gugus – OH

3150, merupakan vibrasi ulur CH₃, CH₂, CH

3040, merupakan vibrasi ulur dari C – H sp² (=CH–)

2950, merupakan vibrasi ulur asimetriis C – H

1690, merupakan vibrasi ulur gugus C = O bebas

1643, merupakan vibrasi ulur gugus C = O

1625, merupakan vibrasi ulur gugus C = O

1450, merupakan vibrasi ulur tekuk dari C = C (sp²) yang terletak pada ikatan rangkap benzene

1390, merupakan vibrasi ulur tekuk C – H dari CH₃

1140, merupakan vibrasi ulur dari C – O

Dari data spektrum IR dapat diduga bahwa senyawa A merupakan senyawa yang mengandung gugus –OH, gugus –CH₃, –CH₂, dan –CH, serta gugus C = O bebas dari keton / aldehid / asam karboksilat, yang terkhelasi dan terdapat ikatan rangkap 2.

Spektrum resonansi magnet inti-proton (^1H -NMR) pada (lampiran 3) menggunakan pelarut aseton- d_6 dan standar dalam TMS memberikan sinyal – sinyal pada pergeseran kimia (δ) sebagai berikut:

- 13,3 dan 11,1 (masing – masing s,1H), letaknya sangat down field, biasanya merupakan sinyal proton dari gugus hidroksil (OH) yang terkhelasi dengan gugus karbonil dalam bentuk jembatan hydrogen pada 13,3 dan agak lemah pada 11,1 ppm.
- 5,98 (s,1H) merupakan proton dari gugus fenil yang tidak mempunyai proton tetangga.
- 2,65 dan 2,64 (masing – masing s,3H) merupakan proton dari gugus $-\text{CH}_3$ (metil) yang letaknya berdekatan dengan gugus karbonil.
- 2,05 (s,3H), merupakan proton gugus CH_3 , dan terikat pada inti aromatic.
- 1,75 (s,3H), merupakan gugus metil bebas.
- 1,60 (s,1H), merupakan proton dari gugus hidroksi bebas.

Spektrum resonansi magnet inti-karbon (^{13}C -NMR) dapat dilihat pada (lampiran 4). Pada spektrum tersebut terlihat ada 18 signal dari 0 – 210 ppm, berarti senyawa A terdiri dari 18 atom C.

- Pada $\delta = 201,2$ ppm menunjukkan sinyal karbon dari gugus karbonil bebas.
- Pada $\delta = 200,9$ ppm merupakan sinyal karbon dari gugus karbonil yang terkhelasi lemah, dengan proton dari gugus OH.

- Pada $\delta = 191,6$ ppm merupakan sinyal karbon dari gugus karbonil yang terkhelasi kuat dengan proton dari gugus OH.

Sedangkan pada pergeseran kimia, berdasarkan analisis Spektrum DEPT (lampiran 5) memperlihatkan adanya 4 gugus metil ($-\text{CH}_3$), yang masing-masing muncul pada $\delta = 31,5; 31,1; 27,9; 7,5$ ppm dan 1 gugus metin ($-\text{CH}$) muncul pada pergeseran kimia $\delta = 58,5 - 201,2$ ppm.

Spektrum massa senyawa A (lampiran 6) memberikan massa molekul M^- dengan $m/z = 344$. Dari data ^{13}C -NMR didapatkan 18 buah atom karbon dan dari data ^1H -NMR didapat 16 proton, sehingga jumlah atom oksigen adalah:

$$\frac{344 - \{18 \times \text{BA C (12)} + 16 \times \text{BA H (1)}\}}{\text{BA O (16)}} = \frac{112}{16} = 7 \text{ buah}$$

Oleh karena itu rumus molekul senyawa A adalah $\text{C}_{18}\text{H}_{16}\text{O}_7$ sedangkan jumlah cincin dan ikatan rangkap senyawa A dapat dihitung berdasarkan rumus indeks kekurangan hidrogen²³

$$F = X - 0,5Y + 0,5Z + 1$$

Dimana ;

F = jumlah cincin dan ikatan rangkap

X = jumlah atom C (tetravalensi)

Y = jumlah atom H, F, Cl, dan Br (monovalensi)

Z = jumlah atom N dan P (trivalensi)

$$\text{Maka ; } F = 18 - (0,5 \times 16) + (0,5 \times 0) + 1$$

$$F = 18 - (8) + 1$$

$$F = 11.$$

Dengan demikian jumlah ikatan rangkap dan cincin adalah 11 buah. Dari data IR dan $^1\text{H-NMR}$ maka, terdapat 1 buah ikatan rangkap dari gugus keton yang bebas, 2 buah ikatan rangkap dari gugus asetil, sedangkan 5 buah ikatan rangkap merupakan ikatan rangkap dari cincin aromatic dan vinilik yang terkonyugasi. Dengan demikian senyawa A terbentuk dari 3 buah cincin di mana di dalamnya terdapat 8 ikatan rangkap dari gugus karbonil, cincin aromatic dan vinilik terkonyugasi.

Untuk mengetahui lebih jelas struktur senyawa A, maka dilakukan perbandingan data $^{13}\text{C-NMR}$ senyawa A dengan spektrum asam usnat yang diperoleh dari *Usnea bayleyi* (hasil penelitian dari Budi Arman) ²⁶ dan asam usnat yang diperoleh dari *Usnea dasypoga* (hasil penelitian dari Layla Gani) ²⁷, lihat Tabel 6 dan Tabel 7.

Tabel. 6

**Perbandingan Data Spektra ^1H -NMR dari senyawa A
Yang diperoleh dari hasil Isolasi dengan Asam Usnat
Yang diperoleh dari Budi Arman ²⁶ dan Layla Gani ²⁷**

No	Senyawa A	Asam Usnat hasil Isolasi	
		Budi Arman	Layla Gani
1	13.3 (s,1H)	13.5 (s,1H)	13.3 (s,1H)
2	11.02 (s,1H)	11.1 (s,1H)	11.03 (s,1H)
3	5.97 (s,1H)	5.98 (s,1H)	5.97 (s,1H)
4	2.67 (s,3H)	2.65 (s,3H)	2.67 (s,3H)
5	2.65 (s,3H)	2.64 (s,3H)	2.65 (s,3H)
6	2.09 (s,3H)	2.15 (s,3H)	2.10 (s,3H)
7	1.75 (s,3H)	1.75 (s,3H)	1.75 (s,3H)
8	1.60 (s,1H)	1.20 (s,1H)	1.24 (s,1H)

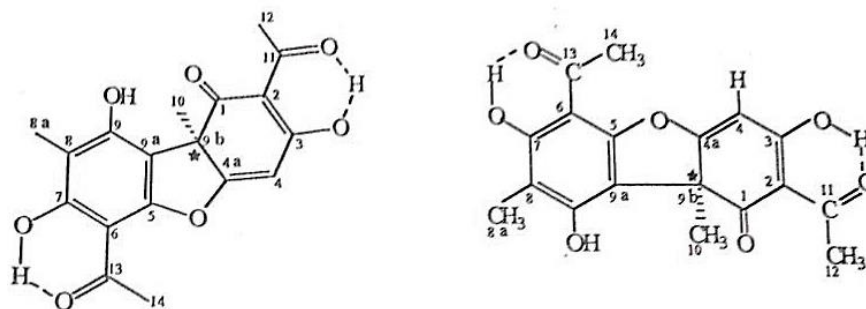
Tabel. 7

**Perbandingan Data Spektra ^{13}C -NMR dari Senyawa A
Yang diperoleh dari hasil Isolasi dengan Asam Usnat
Yang diperoleh dari Budi Arman dan Layla Gani**

No	Senyawa A	Asam Usnat hasil Isolasi	
		Budi Arman	Layla Gani
1	201.7	201.7	201.8
2	200.9	200.3	200.3
3	198.1	198.1	198.1

4	191.6	191.6	191.7
5	179.3	179.3	179.4
6	162.5	163.8	163.9
7	156.8	157.4	157.5
8	155.2	155.2	155.2
9	107.2	109.3	109.3
10	106.2	105.2	105.2
11	104.9	103.9	103.9
12	101.2	101.5	101.5
13	98.3	98.3	98.3
14	58.5	59.0	59.0
15	31.5	32.1	32.1
16	31.1	31.3	31.3
17	27.9	27.8	27.9
18	7.5	7.5	7.5

Struktur asama usnat dari *Usnea bayleyi* dan struktur senyawa A yang diusulkan :



Gambar. 5.1. Asam usnat dan *Usnea bayleyi*

Senyawa A

Biosintesis senyawa A (asam usnat) diduga berasal dari asam poliketo karboksilat, seperti digambarkan dalam skema berikut ²⁵ :

Tabel. 8
Perbandingan Data Spektra ¹³C-NMR dari asam usnat
Dari *Usnea Bayleyi*, asam usnat dari *Usnea dasypoga*
Dan senyawa A

No	Atom C	Asam usnat dari <i>Usnea bayleyi</i>	Asam usnat dari <i>Usnea dasypoga</i>	Senyawa A
1	11	201.7	201.8	201.7
2	1	200.3	200.3	200.9
3	3	198.1	198.1	198.1
4	13	191.6	191.7	191.6
5	7	179.3	179.4	179.3
6	9	163.8	163.9	162.5
7	5	157.4	157.5	156.8
8	4a	155.2	155.2	155.2
9	2	109.3	109.3	107.2
10	8	105.2	105.2	106.2
11	9a	103.9	103.9	104.9
12	4	101.5	101.5	101.2
13	6	98.3	98.3	98.3
14	9b	59.0	59.0	58.5
15	14	32.1	32.1	31.5
16	10	31.3	31.3	31.1
17	12	25.8	27.9	27.9
18	8a	7.5	7.5	7.5

Berdasarkan sifat fisik dari senyawa A, dibandingkan dengan sifat fisik asam usnat menurut literature ¹³ dan sifat fisik hasil isolate tanaman *Usnea bayleyi* ²⁶ (asam usnat diperoleh dari hasil penelitian

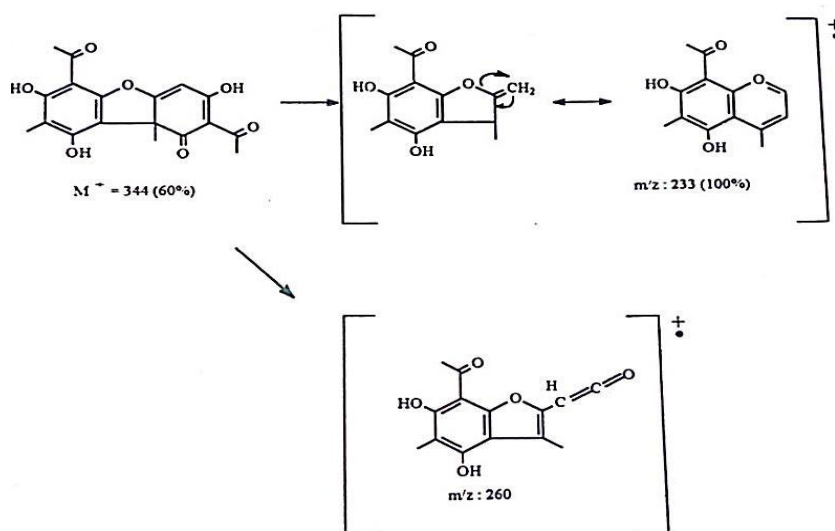
Budi Arman) mendekati kesamaan dalam rotasi optiknya (menggunakan pelarut CHCl_3) dan pada pemeriksaan titik leleh juga memberikan data yang hamper sama, dapat diliat pada Tabel 9.

Tabel. 9

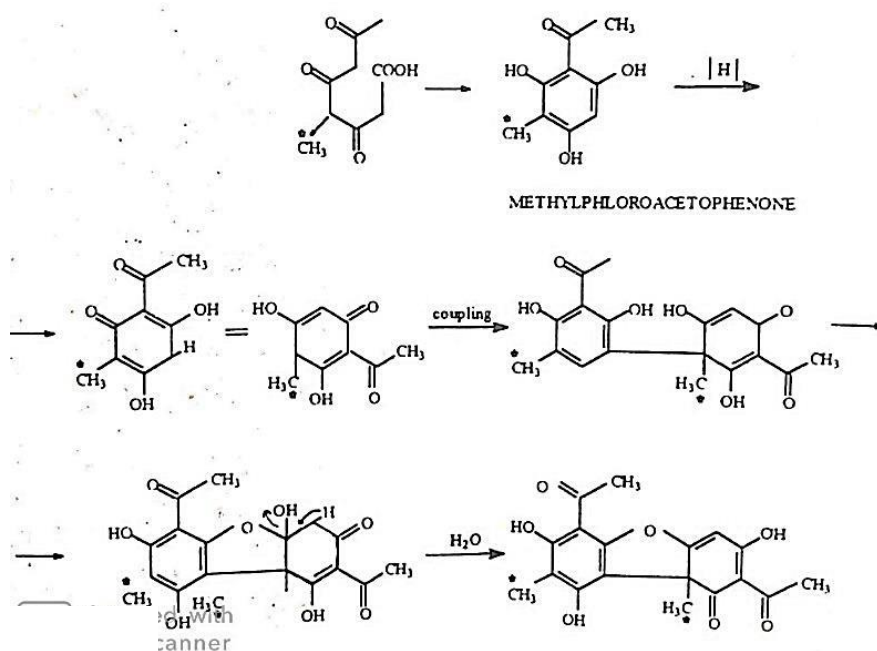
Perbandingan Sifat Fisik dan Bentuk Fisik serta Rotasi Optik dan Kelarutan asam usnat menurut literatur, asam usnat dari *Usnea bayleyi* dan senyawa A.

	Asam usnat menurut literatur	Asam usnat dari <i>Usnea bayleyi</i>	Senyawa A
Titik leleh	203 – 204°C	199 – 202°C	203.5 – 203.8°C
Rotasi optic	$[\alpha]_D^{20} = +495^\circ$	$[\alpha]_D^{27} = +500^\circ$	$[\alpha]_D^{25} = +492^\circ$
Kelarutan	Dalam kloroform dan aseton	Dalam kloroform	Dalam kloroform dan aseton
Bentuk fisik	Kristal warna kuning seperti jarum	Kristal warna kuning seperti jarum	Kristal warna kuning seperti jarum

Bedasarkan dari data spektra tersebut dan hasil pembahasan serta sifat fisik, maka disimpulkan senyawa A tersebut adalah merupakan (+) Asam usnat. Perkiraan pola fragmentasi senyawa A ²⁵ dapat dilihat pada gambar.



Gambar. 6. Pola fragmentasi senyawa A



Gambar 7. Biosintesis dari Asam usnat melalui oksidasi penggabungan poliketida

4.2.2. Penentuan Struktur Molekul Senyawa B.

Senyawa B berasal dari fraksi aseton, berupa Kristal berwarna putih, dengan titik leleh $262 - 263^{\circ}\text{C}$. pengukuran dengan spektrofotometer infra meran (lampiran 7) memberikan pita serapan pada daerah bilangan gelombang ($\bar{\nu}$, cm^{-1}) sebagai berikut :

- 3427, merupakan vibrasi ulur gugus $-\text{OH}$.
- 2930, merupakan vibrasi uluru gugus ($-\text{CH}_2-$, metilena).
- 1763, merupakan vibrasi ulur karbonil dari gugus lakton tidak bebas.
- 1656, merupakan vibrasi ulur $\text{C} = \text{C}$.
- 1571, merupakan vibrasi ulur $\text{C} = \text{O}$, dari lakton terdapat yang terkhelasi.
- 1445, merupakan vibrasi tekuk dari $\text{C} - \text{H}$ yang terdapat pada ikatan rangkap pada benzena.
- 1385, merupakan vibrasi tekuk $\text{C} - \text{H}$ daari CH_3 .

Dari data spectrum IR dapat diduga bahwa senyawa B merupakan senyawa yang mengandung gugus $-\text{OH}$, gugus $-\text{CH}_3$, $-\text{CH}_2$, $\text{C} - \text{H}$ yang terdapat pada ikatan rangkap, $\text{C} = \text{O}$ (lakton tidak bebas, lakton terkhelasi dan aldehida yang terkhelasi)

Spectrum resonansi magnit inti-proton (^1H -NMR, lampiran 8), memberikan sinyal-sinyal pada pergeseran kimia (δ , ppm) sebagai berikut :

- 12,27 (s,1H), letak sangat “down field”, merupakan senyawa proton dari gugus OH yang terkhelasi dengan gugus karbonil dalam bentuk jembatan hidrogen yang lemah.
- 10,63 (s,1H), merupakan sinyal proton yang mencirikan adanya gugus aldehida yang terkhelasi (agak down field)
- 7,09 (d,1H), merupakan sinyal proton gugus OH yang terdapat pada α, β , - δ -lakton tidak jenuh.
- 6,83 (s,1H), merupakan sinyal proton dari cincin aromatik.
- 3,99 (s,1H), merupakan proton dari metin hidroksi, dari pada α, β , - δ -lakton tidak jenuh.
- 2,52 (s,3H), merupakan proton dari gugus metil yang terkait pada inti aromatik.
- 2,27 (s,2H), merupakan proton dari gugus metilina yang dekat / langsung terikat pada cincin aromatik.
- 2,09 (s,3H), merupakan proton yang membentuk gugus metil.

Dengan kata lain dapat disimpulkan bahwa dari data $^1\text{H-NMR}$, senyawa B mempunyai 14 proton yang sama, 6 proton berasal dari 2 gugus metil, 2 proton dari sebuah gugus metilen, 1 proton dari gugus metinil hidroksi, 1 proton dari gugus hidroksil bebas, 1 proton dari aldehida yang terkhelasi dan 2 proton aromatik pada pergeseran kimia, $\delta = 7,09$ ppm.

Dari data spectrum karbon ($^{13}\text{C-NMR}$, lampiran 9) dan data DEPT nya (lampiran 10), menunjukkan senyawa B terdiri dari 19 atom karbon, yaitu :

- Atom karbon dari karbonil bebas, yang berasal dari gugus lakton (depsidon), $\delta = 192,7$ ppm.
- 1 atom karbon dari karbonil yang berasal dari gugus aldehida yang terkhelasi, $\delta = 186,6$ ppm.
- 1 atom karbon dari karbonil yang terkhelasi dan berasal dari cincin α, β , - δ -lakton tidak jenuh, $\delta = 1665,5$ ppm.
- 11 atom karbon kuartener (sp^2) dari cincin aromatik, $\delta = 162,4$; 160,7; 158,8; 148,1; 137,4; 135,9; 131,9; 120,8; 117,4; 114,4; 109,6 ppm.
- 1 atom karbon dari cincin metinil aromatik, $\delta = 112,8$ ppm
- 1 atom karbon dari gugus metinil hidroksi yang berasal dari cincin α, β , - δ -lakton tidak jenuh, $\delta = 52,6$ ppm.
- Atom karbon dari 2 gugus metil, $\delta = 21,5$ dan 9,6 ppm.

Adanya sebuah gugus aldehida yang terkhelasi, sebuah gugus metinil aromatik, sebuah gugus metinil hidroksi dari sistim ester siklik (lakton), sebuah gugus metilina yang terikat langsung pada cincin aromatik dan 2 buah gugus metil yang masing – masing terikat pada cincin aromatik diperkuat lagi dengan adanya 5 buah sinyal pada spektrum DEPT.

Berdasarkan data karbon (^{13}C -NMR) didapatkan 19 buah atom karbon dan dari data proton (^1H -NMR) didapat proton sebanyak 14 buah atom hidrogen, sehingga jumlah atom oksigen adalah :

$$\frac{386 - \{19 \times \text{BA C (12)} + 14 \times \text{BA H (1)}\}}{\text{BA O (16)}} = \frac{114}{16} = 9 \text{ buah}$$

386 = merupakan massa molekul senyawa B.

Maka didapat rumus molekul senyawa B adalah $C_{19}H_{19}O_9$. Jumlah cincin dan ikatan rangkap senyawa B dapat dihitung berdasarkan rumus indeks kekurangan hidrogen :

$$F = X - 0,5Y + 0,5Z + 1$$

Maka;

$$F = 19 - (0,5 \times 14) + (0,5 \times 0) + 1$$

$$F = 19 - (7) + 1$$

$$F = 13$$

Oleh karena itu, dapat dinyatakan bahwa jumlah ikatan rangkap dan cincin pada senyawa B, yaitu 3 buah ikatan rangkap dari gugus karbonil, 6 buah ikatan rangkap dari 2 buah cincin aromatik, berarti senyawa B terbentuk dari 4 buah cincin.

Menurut Elix ²⁹, bahwa senyawa B diduga adalah asam norstiktat *, (BM = 372), tetapi dari data spectrum massanya, maka senyawa B ini mempunyai puncak massanya, maka senyawa B ini mempunyai puncak ion molekul pada $m/z = 386$. Ini berarti ada kelebihan 14 satuan massa atom, bila senyawa B adalah asam stiktat *, oleh karena massa molekul asam stiktat adalah 386. Bila pola fragmentasi dari senyawa B, asam norstiktat dan asam stiktat ²⁸ dibandingkan, maka jelaslah bahwa senyawa B struktur lebih mendekati, atau dengan kata lain, bahwa senyawa B merupakan turunan (derivat) dari asam norstiktat, lihat Tabel dibawah ini.

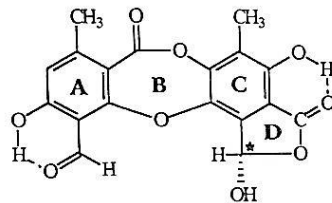
Tabel. 10
Perbandingan Pola Fragmentasi
Senyawa B, Asam Norstiktat, dan Asam Stiktat

	Senyawa B	Asam norstiktat	Asam stiktat
Pola Fragmentasi	386 (M ⁺), 372, 354, 326, 179, 177, 55 (100%)	372 (M ⁺), 354, 326, 179, 55 (100%)	386 (M ⁺), 386, 346, 193, 191

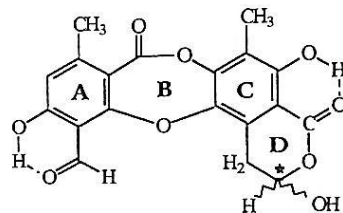
Dari data spektrum massanya, maka diduga bahwa senyawa B merupakan turunan dari asam norstiktat, tetapi kelebihan sebuah gugus metilen ($-\text{CH}_2-$, 14 satuan massa atom). Adanya gugus metilen tersebut diperkuat dengan munculnya sinyal atom karbon metilina pada $\delta = 52,8$ ppm (lampiran 11), demikian juga adanya gugus metilen tersebut diamati pada spektrum $^1\text{H-NMR}$ -nya.

Dugaan yang paling tepat, bahwa gugus metilen merupakan perluasan dari cincin α, β , - δ -lakton tidak jenuh (cincin lima) dan letaknya bukan sebagai metil ester, tetapi sebagai etil ester yang terikat langsung dari cincin aromatik. Sehingga diduga senyawa B merupakan turunan asam norstiktat tetapi cincin D-nya, merupakan cincin α, β , - δ -lakton tidak jenuh (cincin enam). Bila dugaan tentang struktur senyawa B seperti diuraikan diatas adalah betul, maka berarti struktur senyawa B adalah struktur baru, dari ratusan struktur yang pernah diketemukan tanaman **Lichen**. Kemungkinan lain dari struktur senyawa B adalah

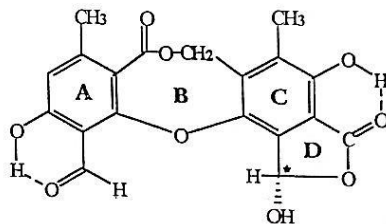
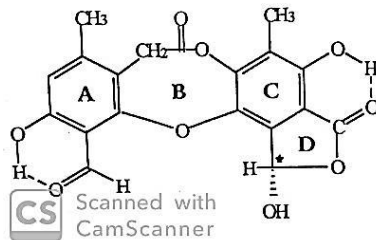
merupakan turunan depsidon yang dibentuk dari **benzyl ester** ³⁰, dimana hal ini juga sesuai dengan kemungkinan jalur metabolisme dari produk **Lichen** ¹. Oleh karena itu dicoba atau diusulkan untuk memberikan nama pada senyawa B tersebut, sebagai **asam norstiktat A**.



Struktur 7 asam norstiktat

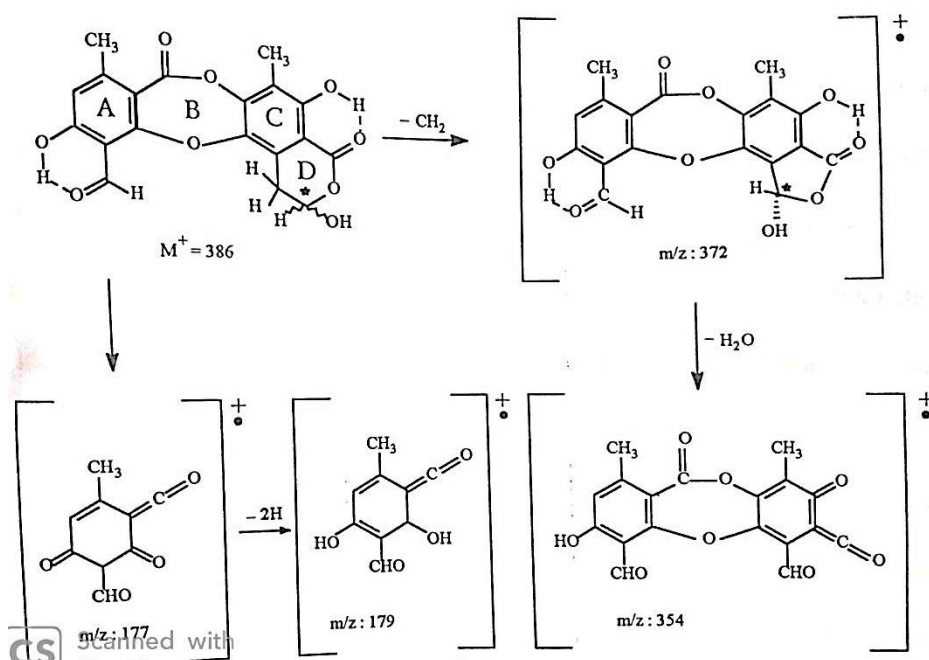


Struktur senyawa B yang diusulkan



Gambar 8. Struktur senyawa B yang diusulkan

Dari data spektrum massa, maka diperkirakan pola fragmentasi B senyawa mirip dengan pola fragmentasi asam norstiktat ²⁸.



Gambar 9. Pola Fragmentasi Senyawa B

4.3. Pengujian Aktivitas Biologi

Tanaman *Ramalina inflata* yang termasuk dalam kelompok Lichen mempunyai banyak manfaat bagi kehidupan manusia, salah satunya adalah sebagai antibiotika.

Dalam uji aktivitas anti bakteri pada penelitian ini, digunakan kuman uji berdasarkan pendekatan terhadap penyebab penyakit tersebut. *Staphylococcus aureus* merupakan kuman gram positif dan *Escherichia coli* berupa gram negatif, serta *Pseudomonas aeruginosa* mewakili gram negatif, di mana ketiga kuman uji ini diketahui sebagai penyebab timbulnya perut/diare dan penyakit kulit (*Pseudomonas aeruginosa*).

Pada pemeriksaan sifat anti bakteri, dilakukan pengujian dengan menggunakan metode silinder baja tahan karat, untuk penentuan diameter daerah hambatan (DDH) dan metode penipisan lempeng agar, serta metode dilusi pengenceran serial tabung, untuk penentuan konsentrasi hambatan minimum (KHM).

Dari pengujian aktivitas biologi senyawa A, senyawa B dan juga dipakai ampicillin sebagai antibiotika pembanding, diperoleh hasil bahwa untuk senyawa A mempunyai efek menghambat pertumbuhan kuman yang cukup bermakna terhadap kuman uji *Staphylococcus aureus*, pada konsentrasi hambat minimum 1000 $\mu\text{g/mL}$, sedang untuk kuman uji *Escherichia coli* dan *Pseudomonas aeruginosa*, sedangkan senyawa B tidak memberikan hasil.

Bagi ekstrak kasar dari fraksi n-heksana dan aseton untuk KHM terhadap kuman uji cukup memberikan hambatan yang bermakna dan juga pada DDH untuk ekstrak aseton memberikan hasil yang bermakna, begitu juga halnya dengan ekstrak n-heksana (lihat Tabel 2;3;4 dan Tabel 5, serta lampiran 12).

4.4. Teori Lumut Kerak (Lichenes)

Di suatu ekosistem, tanaman Lumut Kerak (Lichenes) berperan sebagai dekomposer yang mampu mempertahankan persediaan nutrient organik yang sangat penting bagi pertumbuhan tanaman. Tanpa dekomposer, elemen-elemen penting bagi tumbuhan seperti karbon, nitrogen, dan unsur lainnya akan terakumulasi di dalam bangkai dan sampah organik sehingga nutrient organik tidak tersedia bagi tumbuhan. Kemampuan tumbuhan diatas substrat

yang cukup beragam yaitu di 7 permukaan batang pohon, permukaan bebatuan dan tanah nienjadikan Lichenes sebagai salah satu decomposer, jenis tumbuhan ini jugsan berperan sebagai oindikator pencemaran lingkungan (Campbell, Reece dan Mitchell 2010).

4.4.1. Karakteristik Lichenes

Lumut kerak (Lichenes) merupakan tumbuhan tingkat rendah yang termasuk dalam Divisio Thallophyta yang merupakan tumbuhan komposit dan perpaduan fisiologik dari dua makhluk yakni antara fungi dan alga. Dua organisme tersebut hidup herasosiasi satu sama lain, sehingga muncul sebagai satu organisme. Penyusun komponen fungi disebut Mycobiont yang pada umumnya berasal dari kelas Ascomycetes dan dua atau tiga genus termasuk Basidiomycetes, sedangkan penyusun komponen alga disebut Phycobiont, berasal dari Divisio alga biru-hijau (Chyanophyceae) atau alga hijau (Chorophyceae) (Tjitrosoepomo, Taksonomi Tumbuhan 2001).

Lichenes adalah hasil simbiosis antara tumbuhan yang terdiri dari fungi dan satu atau lebih mitra fotosintesis, umumnya merupakan alga hijau atau cyanobacterium. Lichenes sekilas mirip dengan alga, kunci untuk membedakan Lichenes dengan alga adalah tekstur, distribusi dan warna yang paling menonjol (Nash 2008). Pada Lichenes, alga menghasilkan makanan (karbohidrat) karena fungi tidak bisa membuat makanan sendiri, energi didapatkan dari alga. Hubungan simbiosis fungi dan alga membantu Lichenes

heradaptasi dengan kehidupan di semua tempat. Lichenes inembutuhkan air dan sinar matahari untuk tumbuh. Beberapa spesies dapat menyerap air hingga 20 kali berat tubuhnya (Whitesel 2006).

Di dunia ini ada sekitar 20.000 spesies alga. Sebagian besar berada di daerah tropic sebagai wilayah dengan tingkat keragaman organisme yang tinggi. Lichenes merupakan tumbuhan yang mampu hidup di daerah ekstrem di permukaan bumi. Mereka dapat tumbuh di permukaan tanah, bebatuan, pepohonan bahkan permukaan - permukaan benda buatan manusia. Mereka ada di tempat yang jarang ada organisme yang mampu hidup di sana seperti puncak gunung, padang pasir, dan daerah kutub. Di samping itu, Lichenes seringkali tumbuh di pohon dan semak - semak sebagai epifit, mereka tidak mengambil makanan dari organisme yang ditempelinya akan tetapi mengambil makanan dari atmosfer.

Lichenes sangat beragam ukuran, warna dan bentuk. Mereka juga mampu berubah warna selama musim hujan ketika terbilas oleh air dan menghasilkan makanan (Roziaty 2016).

Salah satu karakteristik Lichenes adalah bahwa mereka lambat berkembang dan lambat tumbuh. Sebagian besar bentuk tumbuh hanya beberapa milimeter per tahun. Tanaman Lumut Kerak (Lichenes) tidak memiliki akar, batang dan daun, sehingga mereka menyerap sebagian besar nutrisi mereka dari curah hujan. Lichenes bertindak seperti spons, menyerap segala sesuatu yang larut dalam air hujan dan mempertahankannya (Halcomb 2010).

4.4.2. Klasifikasi Lichenes

Tanaman Lumut Kerak (Lichenes) sulit untuk diklasifikasikan karena lumut kerak ini merupakan gabungan dari alga dan juga fungi. Fungi merupakan salah satu organisme heterotrof yang tidak termasuk tumbuhan maupun hewan, yaitu termasuk dalam regnum fungi. Fungi dapat hidup sebagai saprob atau parasit. Saprob merupakan organisme yang hidup dari bahan organik mati, sedangkan parasit adalah organisme yang hidup pada organisme hidup lain dan mengambil makanan darinya. Dua organisme antara fungi dan alga tersebut hidup berasosiasi satu sama lain, sehingga muncul sebagai satu organisme. Penyusun komponen fungi disebut Mycobiont yang pada umumnya berasal dari kelas Ascomycetes dan dua atau tiga genus termasuk kelas Basidiomycetes, sedangkan penyusun komponen alga disebut Phycobiont, berasal dari divisi alga hiru-hijau (Chyanophyceae) atau alga hijau (Chlorophyta) (Pratiwi, 2006).

Menurut Misra & Agrawal (1978), menyatakan bahwa klasifikasi Lumut Kerak (Lichenes) berdasarkan komponen fungi terbagi menjadi tiga tipe, yaitu :

- 1) Ascolichens Pada tipe ini, komponen fungi yang membentuk Lumut Kerak (Lichenes) yang berasal dari kelas Ascomycetes. Tipe ini terbagi dalam dua bagian yaitu:
 - a. Gymnocarpae yang memiliki tubuh buah berupa apotesium dengan struktur terbuka, contohnya Parmelia.

- b. Pyrenocarpae, memiliki tubuh buah berupa peritesium dengan struktur tertutup, contohnya Dermatocarpon.
- 2) Basidiolichens Pada tipe ini, komponen fungi yang membentuk tanaman Lumut Kerak (Lichenes) adalah dari kelas Basidiomycetes. Basidioliches memiliki komponen alga yang termasuk dalam kelas Myxophyceae, berupa filamen (Scytonema) atau non-filamen (Chroococcus).
- 3) Lichen Imperfecti Pada tipe ini, komponen fungi yang membentuk tanaman Lumut Kerak (Lichenes) adalah dari kelas Deuteromycetous dengan contoh antara lain Cystocoleus, Lepraria, Leprocalon, Normandin

4.4.3. Morfologi Lichenes

Tubuh tanaman Lumut Kerak (Lichenes) dinamakan thallus yang secara vegetatif mempunyai kemiripan dengan alga dan jamur. Thallus ini berwarna abu-abu atau abu-abu kehijauan. Beberapa spesies ada yang berwarna kuning, oranye, coklat atau merah dengan habitat yang bervariasi. Raglan tubuh yang memanjang secara sellular dinamakan hifa. Hifa merupakan organ vegetatif dari thallus atau miselium yang biasanya tidak dikenal pada jamur yang bukan Lichenes. Berdasarkan bentuknya Lichenes dihedakan atas empat bentuk (Rosentreter, Bowker and Belnap 2007) :

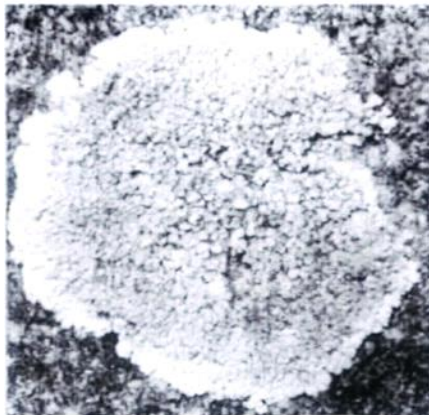
1) Crustose

Lichenes Crustose merupakan salah satu jenis Lichenes yang memiliki thallus yang umumnya berukuran kecil, datar, tipis dan

selalu melekat di permukaan batu, kulit pohon atau di tanah. Sehingga jenis Lichenes ini tidak mudah untuk dicabut tanpa merusak substratnya. Contoh: *Graphis scripta*, *Haematomma puniceum*, *Acarospora* atau *Pleopsidium*.

2) Foliose

Jenis Lichenes Foliose ini memiliki struktur seperti daun yang tersusun oleh lobus-lobus. Lichenes Foliose relatif lebih longgar melekat pada substratnya. Ciri-ciri thallusnya datar, lebar, banyak lekukan seperti daun yang mengkerut dan berputar. Habitat dari Lichenes ini melekat pada batu, ranting, dan rhizines. Rhizines ini juga berfungsi sebagai alat untuk mengabsorpsi makanan. Contoh : *Xantoria*, *Peltigera*, *Parmelia*.



**Gambar 1. Lichenes
Crustose, Sumber;**

(<http://drmgoeswild.com/dr-in-liking-lichens-introduction-to-lichens-and-their-growth-forms/lecanora-muralis-crustose-lichen/>)



**Gambar 2. Lichenes Foliose
Sumber:**

(<http://blogs.reading.ac.uk/whiteknightsbiodiversity/2012/08/16/the-lichen-symbiosis-part-1/copy-of-parmelia-sulcata/>)

3) Fruticose Lichenes

Fruticose memiliki thallus berupa semak dan memiliki banyak cabang dengan bentuk seperti pita. Thallus tumbuh tegak atau menggantung pada batu, daun-daunan atau cabang pohon. Tidak terdapat perbedaan antara permukaan atas dan bawah. Contoh : Usnea, Rainalina, dan Cladonia.

4) Squamulose

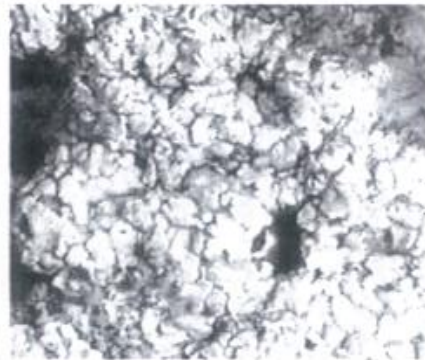
Lichenes jenis Squamulose ini memiliki lobus-lobus seperti sisik, lobus ini disebut squamulus yang biasanya berukuran kecil dan saling bertindih serta saling memiliki struktur tubuh buah yang disebut podetia.



Gambar 3. Lichen Fruticose Gambar

Sumber :

(<https://teara.govt.nz/en/photograph/10984/fruticose-lichen>)



4. Lichen Squamulose

Sumber :

(<http://www.lichens.lastdragon.org/faq/licenthallustype>)

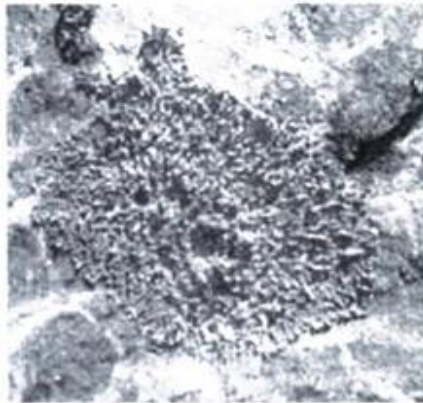
4.4.4. Habitat Lichenes

Lichenes (Lumut Kerak) tidak hanya tumbuh pada pepohonan, tetapi juga di atas tanah terutama di daerah tundra di sekitar kutub utara. Lokasi tumbuhnya dapat di atas maupun di dalam batu dan tidak terikat pada tingginya tempat di atas permukaan laut. Lichenes dapat ditemukan dari tepi pantai sampai di atas gunung-gunung yang tinggi. Tumbuhan ini tergolong dalam tumbuhan perintis yang ikut berperan dalam pembentukan tanah. Beberapa jenis dapat masuk pada bagian pinggir batu-batuan, yang biasa disebut sebagai endolitik (Tjitrosoepino, Taksonomi Tumbuhan 1989).

Berdasarkan habitatnya **Lichenes** dapat dibagi menjadi tiga kategori (Muzzayinah 2005) :

1) Saxicolous

Saxicolous adalah salah satu jenis Lichenes yang hidup di bebatuan. Lichenes ini umumnya hidup menempel pada substrat yang padat dan di daerah dingin. Ciri dari banyaknya terdapat komunitas saxicolous adalah proporsi permukaan batuan yang tidak ditempati oleh lichen lainnya dan ketika lichen yang bertalus (Foliose) mati, dan wilayah menjadi tersedia untuk kolonisasi (Armstrong dan Welch 2007). Contoh: *Ramalina farinacea*, *Acarospora ceruina*, *basidia coprea*, *Aspicillia corcota*.



Gambar 5. Lichen Saxicolous

Sumber :

(<https://www.flickr.com/photos/benetd/18650703389>)



Gambar 6. Lichen Corticolous

Sumber :

(<https://www.alamy.com/stock-photo/pertusaria-albescens.html>)

2) Corticolous

Corticolous adalah jenis Lichenes yang hidup pada kulit pohon. Jenis ini sangat terbatas pada daerah tropis dan subtropis, yang sebagian besar kondisi lingkungannya lembab. Tanaman Lichenes ini ditemukan hidup sebagai epifit pada substrat kulit pohon. Lichenes corticolous merupakan komponen penting ekosistem hutan sebagai organisme autotroph penyumbang biomassa dalam ekosistem tersebut serta peka terhadap perubahan lingkungan akibat pencemaran udara dan perubahan iklim. Contoh: *Graphis elegans*, *Usnea articulata*, *Usnea hirta*, *Usnea ceranita*.

3) Terricolous

Lichenes Terricolous merupakan jenis Lichenes terrestrial, yang hidup pada permukaan tanah. Tanaman jenis ini biasanya membentuk kerak tanah biologis (juga dikenal sebagai microphytic,

microbiotic atau cryptogarnic crusts. Hal ini terjadi di daerah yang luas dari rangeland kering dan semi-kering di kedua belahan Utara dan Selatan, di daerah yang tidak banyak berpasir dan herbatu (Eldridge 1996).

BAB V

KESIMPULAN DAN SARAN

5.1. Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian ini dapat disimpulkan :

1. Tanaman *Ramalina inflata* mengandung senyawa yang termasuk dalam golongan senyawa turunan fenol, antara lain diperoleh senyawa A merupakan (+) -asam usnat; dan senyawa B yang diduga merupakan turunan dari asam norstiktat, dengan rumus molekul $C_{18}H_{16}O_7$, diusulkan diberi nama **asam norsktiktat A** (turunan dari asam norstiktat).
2. Ekstrak n-heksana dan ekstrak aseton mempunyai aktivitas antibakteri terhadap kuman uji *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* dan *Pseudomonas aeruginosa*.
3. Senyawa A mempunyai aktivitas antibakteri terhadap kuman uji *Staphylococcus aureus*, sedangkan senyawa B tidak mempunyai efek terhadap kuman uji.

5.2. Saran

1. Agar dapat dilakukan penelitian lanjutan untuk mendapatkan kandungan senyawa lain dari tanaman *Ramalina inflata* dan disarankan menggunakan metode lain dengan penggunaan pelarut yang sesuai.
2. Pada fraksi aseton diperoleh senyawa B yang tidak memberikan efek, sedan dari ekstrak aseton menunjukkan efek penghambatan terhadap kuman uji. Oleh karena itu diharapkan bagi peneliti selanjutnya untuk dapat meneliti komponen lain

yang memberikan efek terhadap kuman uji dalam fraksi aseton tersebut.

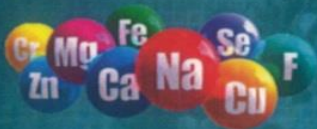
3. Mengingat tumbuhan ini sering digunakan sebagai obat tradisional, sehingga dapat dikembangkan dari tingkat empiris menuju metode ilmiah yang obyektif.

DAFTAR PUSTAKA

1. Cullberson, C.F, Culberson, W.L, Johnson A., “ The *Ramalina Americana complex* (Ascomycotina, *Ramalinaceae*) Chemical and Geographic Corelations”, American Bryological and Lichenological Society Summer, Omaha, v. 93 (2), p. 167 – 186, 1990
2. Stevens, G.N., “Tropical – Sub tropical *Ramalinae* in the *Ramalina farinacea complex* A Lichen”, Discription, Distribution, Morphology, Chemistry, Ecology, v. 15, Academic Press, London, p. 213 – 229, 1983
3. Galloway, D.J., Tropical Lichens : Their Systematic, Concervation and Ecology, special volume no. 43, Departement of Botany, Academic Press, London, 1991
4. Stevens, G.N., The Lichen genus *Ramalina* in Australia, Departement of Botany University of Quisland, St. Lucia, 4067. Australia, 1987
5. Mien, A. Rifai, Kamus Mikologi, Pusat Pembinaan dan Pengembangan Bahasa, Departemen Pendidikan dan Kebudayaan, Jakarta, hal 47, 1979
6. Moat, A.G, Foster, J.W., “Microbial Physiology” John Willey & Sons, Singapore, p. 3 – 8, 1979
7. Elix, J.A, Din, L.B, Samsudin, M.W.B., “ New Species of *Ramalina* (Lichenized Ascomycotina) from Australasia and Malaysia; Bull. Br. Mus. Nat. Hist. (Bot.) 16 (1), Ithaca, N.y., p. 41-44, 1991
8. Kashiwadani,H. “Some Chilean Species of Genus *Ramalina*” (Lichens), Bull-Natl-Sci-Mus-Ser-B-Bot, p. 1 -2 . 1990
9. Misna, A, Agruwal, R.P., 11 Lichens (A Preliminary Text), New Delhi, p. 42 – 47, 1978
10. Purpis,W, Coppins, B.J, Hawkdwoorth, D.L, James, P.W, More, D.M., The Lichen Flora of Great Britain and Ireland, Natural Historical Museum Publication in Assosiation with the British Lichen Society, London, p. 11-12, 1985

11. Alvin, K.L, Kershaw, K.A., "The Observer's Book of Lichens", London – New York, p. 41, 1963
12. Mason, E.H., How to Know The Lichens Products", C. Brown Company Publisherslowa, p. 181, 1969
13. Culberson, C.F, "Chemical and Botanical Guide to Lichen Products", Otto Koeltz, W-Germany, p. 124 – 171, 1979
14. Buchanan, R.E, Buchanan, E.D.m Bakteriologi 5th, ed, The Mac Millan Company, New York, p. 489, 1961
15. Hugo, W.B, Russel, A.D. Pharmaucetical Microbiology, 3rd ed , P.G Publishing, PTC Ltd, Singapore, p. 33, 1984
16. Russel, D, Louis B. Quesnel Antibiotics : Assesment of Anti microbial Activity and Resistance, The Society of applied Bacteriology Technical Series, no. 18, London, 1983
17. Bibiana, W.L, "Analisis Mikroba di Laboratorium", Raja Grafindo Persada, Jakarta, hal. 67 – 72, 1994
18. Harbone, J.B, Metode Fitokimia, ITB Bandung, 1987
19. Sutrisno., "Pereaksi KLT", edisi 1, Fakultas Farmasi Universitas Pancasila, Jakarta, 1986
20. Melnick, J.E, Adelberg, J.L, E.A., Review of Medical Microbiology, 14th ed, Langed Medical Publication, Californi, p. 9 – 17, 1980
21. Williams, D.H, Fleming, I., Spectroscopic Methods in Organic Chemistry, Mc. Gram Hill, London, 1980
22. Sudjadi, Penentuan Struktur Senyawa Organik, Ghalia, Jakarta, 1983
23. Fischer, A.J, Loftus, P., Introduction to NMR Spectroscopy., John Willey & Sons, p. 172, 1991

24. Said, I.M., and Layli, Bin Din, Systematic Identification of Natural Product Departement of Chemistry, Universitas Kebangsaan Malaysia, Proceeding 1988
25. Manitto, P., Biosynthesis of Natural Products, University of Milan, John Willey & Sons, p. 190, 1981
26. Wahyudi Priyono Suwarso and Budi Arman, the Proceeding of International Seminar on Rainforest and Their Utilization for Developments, the University of Andalas, Padang, October 29 – 30, 1996
27. Wahyudi Priyono Suwarso and Ratna Layla Gani, Unpublishing results
28. Schreiner, E, Hafflina, J. (Eds), Bibliotheca Lichenologist, Band 45, J. Crème Verlag, Stuttgart, p.33, 1992
29. Elix, J.A, to Wahyudi Priyono Suwarso, Private Communication
30. Vernon, A, Mason, E.H., "The Lichens", United Kingdom, Academic Press, New York and London, p.497 – 511, 1973



ISOLASI DAN PENENTUAN STRUKTUR MOLEKUL SENYAWA KIMIA

SERTA UJI AKTIVITAS BIOLOGI DARI THALUS RAMALINA INFLATA, HOOK, & TAYL



SEFA BUMI PERSADA
Jl. Malikussaleh No. 3 Bayu - Aceh Utara
email: sefabumipersada@gmail.com
Telp. 085260363550

ISBN 978-023-7048-25-3

